Synthese von Modellpeptiden zur Konformationsuntersuchung

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Somaya Abd El Rahman
aus Port Said/Ägypten

1981

Synthese von Modellpeptiden zur Konformationsuntersuchung

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Somaya Abd El Rahman
aus Port Said/Ägypten

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Februar 1981

Dekan:	Prof. Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Oktober 1977 bis August 1980 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. E. Bayer, danke ich herzlich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. Manfred Mutter danke ich herzlich für die intensive Betreuung und anregende Diskussion bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dozent Dr. Abdel Wahab Abdel Rahman danke ich für grundlegende Diskussionen und viele wertvolle Anregungen bei der Bearbeitung der spektroskopischen Untersuchungen.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Bayer danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit.

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

ABSTRACT

Abd El Rahman, Somaya

Synthese von Modellpeptiden zur Konformationsuntersuchung

In der vorliegenden Arbeit wurden Modellpeptide mit verschiedenen Sequenzen mit Hilfe der Liquid-Phase-Methode (LPM) synthetisiert.
An diesen Peptiden wurden Konformationsuntersuchungen durchgeführt. Dabei wurde der Zusammenhang zwischen Kettenlänge, Solvation, Schutzgruppen am C-terminus des Peptides und der Konformation untersucht.
Zur Identifizierung des Einflusses der makromolekularen Estergruppe (Polyäthylenglykol) auf die Konformation eines Peptids wurden spektroskopische Untersuchungen an PEG-gebundenen Peptiden und an den abgespaltenen Peptiden durchgeführt.
Die CD-Messungen in Lösung und die IR-spektroskopischen Untersuchungen im Festzustand haben gezeigt, daß sich die Anwesenheit von PEG nicht störend auf die Konformation des Peptids auswirkt.
Zum Studium der in Polypeptiden und Proteinen am häufigsten vorkommenden Sekundärstrukturen (ß-turn, ß-Struktur und α-Helix) wurden Modellpeptide dargestellt.
Als Modellpeptide zur Untersuchung der ß-turn-Konformation wurden Tetra- und Hexapeptide, die Gly-Pro oder Aib-Pro-Sequenzen in den Positionen i+1 und i+2 enthalten, synthetisiert.
Die ß-Struktur wurde an Homooligo-L-Ile, die α-Helix Konformation an Homooligo-L-Methionin mittels CD bzw. IR nachgewiesen.
Erstmals wurde in dieser Arbeit die Energie-Transfer-Methode zum Nachweis von interamolekularen Distanzen in Tyrosin- bzw. Tryptophanhaltigen Peptiden herangezogen.
Die Ergebnisse dieser spektroskopischen Untersuchungen stehen in Übereinstimmung mit empirischen Konformationsvorhersagen.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
II.	ALLGEMEINER TEIL	3
1.	Methoden der Peptidsynthese	3
1.1.	Die klassische Peptidsynthese	3
1.2.	Die Solid-Phase-Methode	3
1.3.	Die Polymer-Reagenz-Methode	4
1.4.	Lösliche Polystyrolträger	5
1.5.	Die Liquid-Phase-Methode	5
1.6.	Die Fest-Flüssig-Phasen-Methode	6
2.	Konformationsuntersuchungen	7
2.1.	Allgemeines zur Konformation von Peptiden	7
2.2.	Oligopeptide	12
2.3.	Konformationsanalyse PEG-gebundener Peptide	14
2.4.	Konformationsuntersuchungen mit CD	15
2.5.	IR-Untersuchungen im Festzustand	16
2.6.	Distanzmessungen durch Fluoreszenz-emissionsspektroskopie	17
2.6.1.	Allgemeines zur Methode	17
2.6.2.	Prinzip der Methode	18
3.	Synthese eines Modelltetrapeptids zur Konformationsuntersuchungen	20
3.1.	Synthese des Tetrapeptids am Benzylanker Polymerträger	20
3.2.	Synthese des Tetrapeptids über aliphatische PEG	22
3.3.	Konformationsuntersuchungen des Tetrapeptids	23
3.3.1.	Konformationsuntersuchungen mit CD	23
3.3.2.	Konformationsunterscuhungen mittels IR	26

4.	Synthese von Modellhexapeptiden zur Konformationsuntersuchungen	30
4.1.	Synthese der Modellpeptide	30
4.2.	Konformationsuntersuchungen von Hexapeptiden durch CD	31
4.3.	Konformationsuntersuchungen von Hexapeptiden mit IR	35
4.4.	Distanzmessungen durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie	36
5.	Synthese von Homooligopeptiden zur Konformationsuntersuchungen	42
5.1.	Oligo-L-Isoleucin	42
5.1.1.	Konformationsuntersuchungen von Homooligo-Ile mit CD	43
5.1.2.	Konformationsuntersuchungen von Homooligo-Ile mit IR	49
5.1.3.	Distanzmessungen durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie	52
5.2.	Oligo-L-Methionin	55
5.2.1.	Konformationsuntersuchungen von Homooligo-Met mit CD	56
5.2.2.	Konformationsuntersuchungen mit IR	57
5.2.3.	Distanzmessungen durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie	62
III.	EXPERIMENTELLER TEIL	64
1.	Verwendete Geräte	64
2.	Chemikalien	64
3.	Allgemeine Arbeitsverfahren	65
3.1.	Aminosäureanalysen	65
3.2.	Dünnschichtchromatographie	65
3.3.	Synthese der Boc-Aminosäuren	66

4.	Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz Boc-Val-Pro-Gly-Gly-H	68
4.1.	Über aliphatische PEG-Verknüpfung	68
4.2.	Über die Benzylanker-Gruppe	70
5.	Synthese von Modellhexapeptiden	74
5.1.	Darstellung von Amino-PEG	74
5.2.	Veresterung von Amino PEG mit Boc-Tyr (OBzl)	75
5.3.	Synthese des Hexapeptids der Sequenz Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEGM	76
5.4.	Synthese des Hexapeptids Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEGM	77
5.5.	Synthese des Hexapeptids Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEGM	78
6.	Darstellung der Homooligo Peptide	78
6.1.	Darstellung von Homooligo-L-Ile	78
6.2.	Synthese von Homooligo-L-Met	80
IV.	ZUSAMMENFASSUNG	83
V.	LITERATURVERZEICHNIS	85

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Ac-	Acetyl-
AcOH	Eisessig
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
As	Aminosäure
BOC-	tert.-Butyloxycarbonyl-
Bzl-	Benzyl-
CD	Zirkulardichroismus
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d.Th.	der Theorie
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure-Na-Salz
EtOH	Äthanol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
IR	Infrarot
LPM	Liquid-Phase-Methode
MeOH	Methanol
NMR	Kernmagnetische Resonanz
PEG	Polyäthylenglykol
PEG-M	Polyäthylenglykol-Monomethyläther
RT	Raumtemperatur
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
Z-	Benzyloxycarbonyl

Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den IUPAC-Regeln.

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Durch den engen Zusammenhang zwischen Konformation und biologischer Aktivität von Peptiden hat die Synthese dieser Substanzklasse stark an Bedeutung gewonnen. Bis heute gibt es kein Standardverfahren, nach dem Peptide mit beliebiger Sequenz und Kettenlänge synthetisiert werden können.

Zur Synthese von Modellpeptiden oder Oligopeptiden, wie sie im Zusammenhang mit Konformationsuntersuchungen gebraucht werden, besitzt die in dieser Arbeit angewandte Methode (die Liquid-Phase-Methode) eindeutige Vorteile. Durch den rationellen stufenweisen Aufbau gelingt es, Zusammenhänge zwischen Primärstruktur und Konformation eines Peptids systematisch zu erforschen. Die Liquid-Phase-Methode bietet hier einen besonderen Vorteil: durch den solubilisierenden Einfluß der polymeren Schutzgruppe auf das Peptid können auch schwerlösliche Peptide erstmals ohne besonderen präparativen Aufwand der Konformationsanalyse zugänglich gemacht werden.

Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, Modellpeptide für Konformationsuntersuchungen zu synthetisieren, deren Primärsequenz in systematischer Weise verändert wird. Der Einfluß einzelner Aminosäurereste, ganzer Peptidsequenzen bzw. von C-terminalen Schutzgruppen (PEG) auf die Konformation wird durch spektroskopische Untersuchungen (z.B. CD-, IR-, oder Energie-Transfer) unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Temperatur, Lösungsmittel) ermittelt.

Da es bis heute keine Methode gibt, mit der die Konformation eines Peptids in Lösung direkt ermittelt werden kann, ist man auf eine Kombination verschiedener spektroskopischer Methoden angewiesen, von denen jede spezifische, voneinander unabhängige und oft sich ergänzende Informationen liefert.

Die in dieser Arbeit angewandten Untersuchungsmethoden sind:

- Die Messungen des Zirkulardichroismus (CD)

  Die Messung des CD ist heute die am häufigsten angewandte Untersuchungsmethode zur Ermittlung der Sekundärstruktur von Peptiden. Damit konnte der Einfluß des Lösungsmittels und der Temperatur auf die Konformation eines Peptids an vielen Beispielen demonstriert werden.

- IR-Untersuchungen im Festzustand

  Aus einem Vergleich der Konformationen eines Peptids in Lösung und im Festzustand können wertvolle Rückschlüsse über die Bedeutung der intermolekularen Kräfte gegenüber den - in Lösung dominierenden - intramolekularen Kräften für die Konformation einer Peptidkette gewonnen werden. Bei den hier durchgeführten IR-Untersuchungen an PEG-gebundenen Peptiden war die Frage, ob die in Lösung gefundene intermolekulare ß-Struktur bzw. die α-Helix auch im Festzustand erhalten bleiben, von großem Interesse.

- Distanzmessungen durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie

  Die Bestimmung des strahlungslosen Energieübergangs zwischen 2 Chromophoren durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie kann zur Bestimmung von Moleküldimensionen, d.h. intramolekularen Abständen zwischen chromophoren Gruppen, herangezogen werden.

Die hier untersuchten Sequenzen enthalten einen Tyrosinrest in Position 1 und einen Tryptophanrest in End-Position. Da die Abstände zwischen den Chromophoren Tyr, Trp konformationsabhängig sind, können daraus Rückschlüsse auf die Konformation gezogen werden.
Die Ergebnisse von Konformationsuntersuchungen mittels dieser noch wenig entwickelten Methode, die erstmals hier an PEG-gebundenen Peptiden durchgeführt werden, soll durch den Vergleich mit den Ergebnissen von CD-Messungen und IR-Untersuchungen geprüft werden.

II. ALLGEMEINER TEIL

1. Methoden der Peptidsynthese

1.1. Die klassische Peptidsynthese

Bei der klassischen Peptidsynthese werden die geschützten Komponenten in homogener Lösung gekuppelt.
Nach jedem Reaktionsschritt wird das entstandene Peptid durch Kristallisation oder Säulenchromatogrpahie gereinigt. Es können mehrere größere Fragmente dargestellt und anschließend durch Fragmentkondensation zum gewünschten Peptid verknüpft werden (1,2). Ebenso ist der rein stufenweise Aufbau unter weitestgehender Ausschaltung von Nebenprodukten möglich (3). Die Synthesemethode hat sich für die Darstellung von Peptiden bis zu 30 Aminosäureresten gut gewährt. Eine Begrenzung dieser Methode liegt in den geringen Ausbeuten bei den Fragmentkondensationen und in einer geringen Löslichkeit mancher Sequenzen. Dadurch werden Synthesen nach dieser Methode äußerst zeitaufwendig und kostspielig. Trotzdem wurden Polypeptide wie ACTH (2), Insulin (4), Glucagon (2) und Secretin (3,5) nach dieser Methode synthetisiert.

1.2. Die Solid-Phase-Methode

Um die oben genannten Nachteile der klassischen Synthese zu umgehen, entwickelte Merrifield 1962 (6,7) eine neue Konzeption der Synthesetechnik. Bei diesem Verfahren wird die erste Aminosäure über eine geeignete Ankergruppe C-terminal an eine unlösliche Matrix gebunden.
Als unlösliche Matrix werden vernetztes Polystyrol, Phenol, Formaldehyd-Harze (8,9), Pellicullar-Harze (10), Bürsten-Harze (11) und modifiziertes Sephadex G 25 (12) verwandt. Nach Abspalten der Schutzgruppe wird das Polymerpeptid mit einem großen Überschuß der nächsten, aktivierten Aminosäure umgesetzt. Nach beendeter Kupplung werden

die nicht umgesetzten Aminosäurederivate mit einem geeigneten Lösungsmittel herausgewaschen.
Am Ende der Synthese wird das Peptid vom unlöslichen Träger abgespalten und gereinigt.
Durch die Anwendung hoher Überschüsse werden große Reaktionsausbeuten erzielt. Außerdem kann die Synthese wegen der Einfachheit der Arbeitsweise automatisiert werden (13,14). Da aber quantitativer Umsatz sowie vollständige Entfernung der Schutzgruppen nicht immer erreicht werden können, entstehen Rumpf- und Fehlsequenzen (15,16), die sich nach Abspalten vom Träger nur schwer und oft gar nicht vom gewünschten Peptid abtrennen lassen. Außerdem wird der Syntheseverlauf durch das heterogene System und sterische Faktoren beeinträchtigt (17,18). Mit dieser Methode wurden mit geringem Zeitaufwand viele biologisch interessante Oligopeptide wie Oxytoxin (19,20) und Polypeptide wie Bradykinin (21,22), die Insulin-A-Kette (23), Ribonuclease A (24) und Secretin (25) synthetisiert.

1.3. Die Polymer-Reagenz-Methode

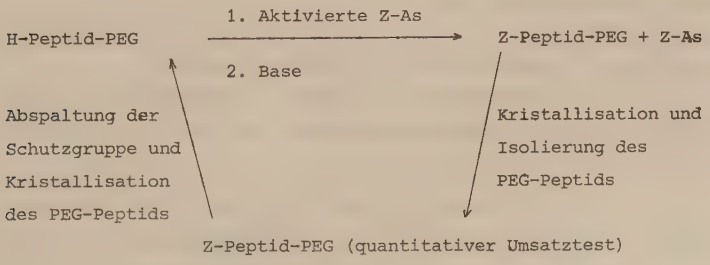
Eine Verbindung zwischen klassischer, stufenweiser Synthese und der Solid-Phase-Methode ist die Polymerreagenzmethode (26). Es werden N-geschützte, aktivierte Aminosäurederivate, die mit einem unlöslichen Polymer verestert sind, mit Peptidestern zur Reaktion gebracht. Durch einen hohen Überschuß an aktivierter Aminosäure können hohe Reaktionsausbeuten erzielt werden. Das überschüssige Reagenz wird abzentrifugiert und das lösliche Peptid fällt bei quantitativer Reaktion rein an.
Mit zunehmender Kettenlänge des Peptids werden durch sterische Effekte die Kupplungsausbeuten geringer. Trotzdem wurden kleinere Peptide mit guten Ausbeuten dargestellt (27,28,29).

1.4. Lösliche Polystyrolträger

M.M. Shemyakin und Ya. A. Ovchinninikov et.al. (30) verwendeten ein chlormethyliertes, lösliches Polystyrol mit einem Molekulargewicht von 200.000 als polymeren Träger, um die Nachteile der Merrifield-Methode zu umgehen.
Der Aufbau des Peptids erfolgt stufenweise vom C-terminalen Ende her.
Die Überschüsse werden nach jeder Kupplung durch Ausfällen des Polymerpeptids abgetrennt.
Diese vorteilhafte Strategie wird beeinträchtigt durch die Bildung von Einschlüssen beim Fällen des Polymers (31), die schlechten Abspaltungsausbeuten nach Beendigung der Synthese und die zunehmende Vernetzung des Polymers im Verlauf der Synthese.

1.5. Die Liquid-Phase-Methode

M. Mutter und E. Bayer entwickelten die Liquid-Phase-Methode, welche viele Vorteile der Merrifield-Methode und der konventionellen Synthese verbindet (32,33,34). Als Trägersubstanz dient bei diesem Verfahren Polyäthylenglykol (PEG), dessen endständige Hydroxylgruppen esterartig mit der C-terminalen Aminosäure verknüpft sind. Auf Grund der guten solubilisierenden Eigenschaften des Polyäthylenglykols kann in homogener Lösung gearbeitet werden, so daß nahezu alle Kupplungsmethoden und Schutzgruppen zur Anwendung kommen können. Der Synthesezyklus besteht aus folgenden Schritten:



Die Vorteile dieser Methode sind:
Alle Reaktionen der Peptidsynthese werden wie beim konventionellen Verfahren in homogener Lösung durchgeführt.
Der Reaktionsablauf ist eindeutig und gleicht in der Kinetik der von niedermolekularen Methyl- oder Äthylestern.
Die Kupplungsschritte können analytisch mit den verschiedensten Verfahren leicht verfolgt werden (35,36,37).
Die Synthesetaktik ist nicht eingeschränkt. Alle Schutzgruppen und Kupplungsmethoden können angewandt werden.
Durch die kurzen Reaktionszeiten und die schnellen Reinigungsoperationen ist der Zeitaufwand gering.
Die erste Aminosäure wird als aliphatischer Peptidester an das Polyäthylenglykol gebunden. Nach Abschluß der Synthese kann das Peptid durch alkalische Hydrolyse, Umesterung, Ammonolyse oder Hydrazinolyse abgespalten werden.
Die C-terminale Aminosäure kann auch als Benzylester (38, 39) an das Polyäthylenglykol fixiert werden.
Das Peptid kann dann hydrogenolytisch, mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure oder mittels Flußsäure abgespalten werden.

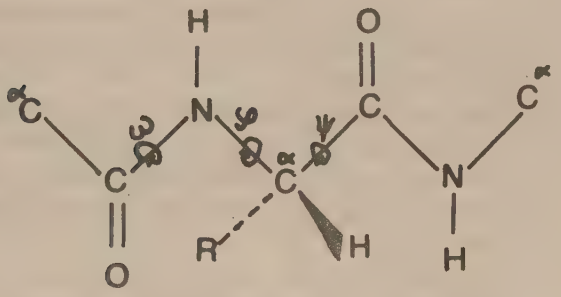
1.6. Die Fest-Flüssig-Phasen-Methode

Eine Kombination der Solid-Phase- mit der Liquid-Phase-Methode wurde von H. Hagenmaier und H. Frank (40,41) entwickelt. Bei dieser alternierenden Fest-Flüssig-Phasen-Methode wird die zu kuppelnde Aminosäure am unlöslichen Träger aktiviert und das C-terminal geschützte Peptidfragment vorübergehend immobilisiert.
Dadurch läßt sich die umgesetzte von der nichtumgesetzten Verbindung durch einfache Filtration trennen.
Ob sich diese Methode durchzusetzen vermag und auch zur Synthese längerer Peptide geeignet ist, wird die Zukunft erweisen.

2. Konformationsuntersuchungen

2.1. Allgemeines zur Konformation von Peptiden

Prinzipiell können Peptide bzw. Proteine in einer Vielzahl von Konformationen vorliegen. Dies ist eine Folge der Rotationsfreiheit um die C^{α}-C(O)-(Diederwinkel ψ) bzw. C^{α}-NH-(φ)-Bindungen entlang dem Peptidgerüst:



Aus röntgenographischen Untersuchungen sind die Werte für die Bindungswinkel und Bindungslängen der Peptideinheit sehr genau bekannt (42,43) (siehe Tab. 1).

Bindung	Länge (A°)	Winkel	Grad
C^{α}-C	1.53	C^{α} CO	120.5
C-N	1.325	C^{α} CN	115
N-C^{α}	1.45	CNH	124
N-H	1.00	CNC^{α}	121
C-O	1.23	NC^{α} C^{β}	110
C^{α}-H	1.00	NC^{α} H	110
C^{α}-C^{β}	1.54	NC^{α} C^{β}	110

Tabelle 1: Bindungslängen und Bindungswinkel der trans-peptideinheit (42)

Wegen des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung ist die Rotation um diese Bindung (ω) stark behindert ($v_o \approx 10$ Kcal/Mol), so daß die Atome einer Peptideinheit (C^{α}-C(O)-N(H)-C^{α}) in einer Ebene liegen. Neuere Röntgenstrukturanalysen an Proteinen haben allerdings ergeben, daß Abweichungen von $\omega = 0°$ (planare Anordnung) bis zu 10° durchaus möglich sind (44). Ebenso häufen sich die Beispiele, in denen die Peptidbindung nicht in der normalerweise gefundenen trans-Konformation, sondern in der energetisch wesentlich ungünstigeren cis-Konformation vorkommen (45). Beispiele hierfür sind zyklische Peptide und Prolin-enthaltende Proteine.

Wegen der thermodynamischen Stabilität definierter dreidimensionaler Strukturen von Proteinen wird die Fülle der sich aus den sterisch erlaubten φ/ψ Winkelkombinationen entlang der Peptidkette ergebenden möglichen Konformationen stark eingeschränkt.

Bei biologisch aktiven Peptiden und Proteinen geht man heute sogar davon aus, daß das jeweilige Makromolekül nur in einer einzigen, der sog. nativen Konformation vorliegt (46).

Anfinsen konnte bereits 1961 zeigen, daß die gesamte Information zur Erlangung dieser einzigartigen, dreidimensionalen Struktur (auch Tertiärstruktur genannt) in der Aufeinanderfolge (Sequenz) der Aminosäurebausteine (Primärstruktur) steckt (47).

Nach Zerstörung der nativen Konformation (Denaturierung) der Ribonuklease unter vollständigem Verlust der biologischen Aktivität gelang es, die native Konformation und damit die biologische Aktivität unter geeigneten Bedingungen zurück zu erhalten (Renaturierung). Als treibende Kraft für die Faltung eines Proteins in die starre, dreidimensionale Struktur werden thermodynamische Größen angesehen (46).

Als allgemein akzeptierte Arbeitshypothese zur Berechnung dieser Struktur geht man heute davon aus, daß die native

Konformation ein Minimum in der freien Energie des Gesamtsystems (Protein plus Lösungsmittel) besitzt (48,49,50).

Die dreidimensionale Anordnung zeichnet sich durch geordnete Struktureinheiten aus, die durch regelmäßige Aufeinanderfolge bestimmter Diederwinkelpaare zustande kommen und durch Wasserstoffbrücken zwischen Carboxylsauerstoffatomen und Amidwasserstoffatomen verschiedener Peptidbindungen stabilisiert werden (Sekundärstruktur).
Bereits 1928 schlugen Meyer und Mark (51) aufgrund von röntgenographischen Untersuchungen eine regelmäßige Faltung von fibrinogenen Proteinen vor. Zu einem Durchbruch auf dem Gebiet der Konformationsanalyse von Proteinen verhalfen schließlich die theoretischen Vorhersagen der drei fundamentalen Strukturprinzipien in Proteinen α-Helix, ß-Struktur (ß-Faltblattstruktur) und ungeordnete Gerüstkonformation (random coil) durch Pauling et al. (52,43) im Jahre 1951. Diese Strukturen wurden anschließend zunächst in synthetischen Polypeptiden nachgewiesen und schließlich auch als dominierende Strukturmerkmale in Proteinen gefunden.

Als wesentliche zur Stabilität der dreidimensionalen Struktur beitragenden Kräfte wurden ermittelt:
Wasserstoffbrückenbindungen, zuerst von Astbury entdeckt (53) und von Mirsky und Pauling (54) in der Bedeutung für die Sekundärstruktur erkannt.
- hydrophobe Bindungen (Kauzmann (55,56))
- Salzbindungen
- Van der Waals-Wechselwirkungen
- Intramolekulare chemische Bindungen z.B. S-S Brücken.

Synthetische Polypeptide sind ideale Modellverbindungen für Konformationsuntersuchungen, da sie in einer Vielzahl von Konformationen vorliegen können, die auch in Proteinen gefunden werden (57).

Bereits früh wurde erkannt, daß Homooligopeptide im Festzustand in der α-Helix, der ß-Struktur und als ungeordnetes Knäuel vorliegen können (oder als Gemisch dieser Strukturen). Später stellte man fest, daß der Polymerisationsgrad, d.h. die Kettenlänge dieser Oligomere, einen entscheidenden Einfluß auf die Konformation im Festzustand und in Lösung besitzen (57).

Ein typisches Beispiel ist Poly(γ-Benzyl)-L-Glu, das Helixstruktur hat, während die niedermolekularen Oligomere in der ß-Struktur vorliegen (58). Blout et al. fanden, daß die Konformation von Homopolypeptiden von der Art der jeweiligen Aminosäure-Bausteine abhängt (59,60). Die Aminosäuren wurden in der Folge in die beiden Klassen "Helix-Bildner" und "nicht-Helixbildner" eingeteilt. Diese Klassifizierung ist später durch die Gruppe "ß-Bildner" erweitert worden. Als wichtigste Kriterien für die Tendenz, Helixstrukturen auszubilden, wurden sterische Faktoren, die sich aus der Wechselwirkung zwischen Seitengruppe und Kettengerüst ergeben, sowie Wechselwirkungen zwischen Peptidkette und Lösungsmittel erkannt (57).
Die gleichen Kräfte scheinen für die Ausbildung von ß-Strukturen entscheidend zu sein. Für die Faltung von Proteinen in die Tertiärstruktur kommen sog. weitreichende Wechselwirkungen hinzu (d.h. zwischen Aminosäuren, die in der Peptidkette weit voneinander entfernt liegen).
Die Bildung hydrophober Bereiche, wie im Myoglobin verwirklicht (61,62) scheint eine treibende Kraft zu sein.
Die enge Verknüpfung zwischen Konformation und biologischer Aktivität eines Proteins war die wesentliche Triebfeder für die intensiven Konformationsstudien an Polypeptiden in den vergangenen Jahren.

Neben theoretischen Ansätzen wurden vor allem durch die Entwicklung neuer analytischer Untersuchungsmethoden in Verbindung mit verbesserten Synthesewegen die experimentellen Konformationsstudien an Polypeptiden in Lösung

stark vorangetrieben. Während die Röntgenstrukturanalyse wertvolle Informationen über die Konformation von Proteinen im Festzustand liefert, dient zur Konformationsanalyse in Lösung zunächst die IR- und UV-Spektroskopie. Den größten Fortschritt brachte die Erschließung des konformationsempfindlichen UV-Bereichs bei ORD- und CD-Messungen, nachdem Moffitt die theoretischen Grundlagen für die Anwendung dieser Methoden geschaffen hatte (63,64). Holzwarth und Doty konnten zeigen, daß eine eindeutige Unterscheidung zwischen α-Helix, ß-Konformation und ungeordneter Struktur eines Polypeptids in Lösung durch Messung des Zirkulardichroismus möglich ist (65).
CD-Messungen unterhalb 200 nm haben diese Ergebnisse bestätigt (66).
Schließlich stellt die Anwendung der hochauflösenden Kernresonanzspektroskopie eine weitere, äußerst wertvolle Methode zur Untersuchung der Konformation von Polypeptiden in Lösung dar (67).
Aus der statistisch mechanischen Behandlung von Konformationsübergängen wurden wichtige Erkenntnisse über den Mechanismus des sog. "Helix-Coil" Überganges, sowie über die Stabilität von Sekundärstrukturen gewonnen (68,69). Theoretische Arbeiten haben dabei zu einem realistischen, hilfreichen Modell zur Behandlung von Konformationsübergängen geführt (70,71-75). Keine der angeführten Methoden liefert im Augenblick eine umfassende Information über die dreidimensionale Anordnung eines Proteins in Lösung, vielmehr ergänzen sich die verschiedenen Untersuchungsmethoden gegenseitig.

Die gegenwärtige Situation ist deshalb gekennzeichnet durch die Bestrebungen, alle angeführten experimentellen und theoretischen Methoden zum Studium der Konformation von Polypeptiden gleichzeitig heranzuziehen, um ein möglichst detailliertes Bild von den konformationsbildenden Kräften innerhalb eines Proteins zu erhalten. Dabei kommt dem engen Wechselspiel zwischen experimenteller und theoretischer

Konformationsanalyse eine stetig wachsende Bedeutung zu. Auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Konformationsuntersuchungen an Oligopeptiden und Homooligopeptiden wird dieser Weg beschritten.

2.2. Oligopeptide

Oligopeptide eignen sich hervorragend als Modellverbindungen zum Studium von Sekundärstrukturen wie α-Helix, ß-Struktur oder "Bendkonformation" in Polypeptiden und Proteinen (57, 76). Systematische Untersuchungen an verschiedenen Homooligopeptiden insbesondere an Oligo-L-Glutaminsäure-γ-benzylester und Oligo-L-Lysin haben wesentlichen Aufschluß gebracht über Endgruppeneffekte, Lösungsmitteleinfluß und die Rolle der kurz- und weitreichenden Wechselwirkungen auf die Konformation (77,78).
Außerdem liefert die Konformationsanalyse dieser Oligomere wesentliche Information über das spektroskopische Verhalten geordneter Strukturen. Von besonderem Interesse sind Homooligomere, die eine starke Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen besitzen und somit eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung geordneter Strukturen in Proteinen spielen. Dazu zählen vor allem die polaren Aminosäuren, die infolge Van der Waal'scher und hydrophober Wechselwirkungen oft in ß-artigen Strukturen vorliegen.

Die hydrophoben Seitenketten, verbunden mit der Tendenz zur Aggregation verleihen diesen Peptiden hinsichtlich der Synthese äußerst ungünstige Löslichkeitseigenschaften. Systematische Konformationsuntersuchungen dieser Oligomere scheiterten deshalb in der Vergangenheit vielfach an unüberwindlichen synthetischen Schwierigkeiten.
Zur Umgehung des Löslichkeitsproblems wurde versucht, solubilisierende Schutzgruppen an beide Kettenenden der Oligomere zu fixieren. Vor allem sollte erreicht werden, daß das Peptid auf diese Weise in helix-fördernden Lösungsmitteln, die bei Konformationsuntersuchungen Verwendung

finden, genügend solubilisiert wird. Gratzer und Doty (79) führten Untersuchungen un einem Poly-L-Alanin-Block durch, der von zwei Poly-D,L-Glutaminsäure-Blöcken flankiert war (1):

$$(D,L\text{-}Glu)_m - (L\text{-}Ala)_n - (D,L\text{-}Glu)_m \qquad (1)$$

Ingwall und Scheraga (80) verwendeten ebenfalls ein Blockcopolymer auf der Basis von D,L-Lysin (2):

$$(D,L\text{-}Lys)_m - (L\text{-}Ala)_{10} - (D,L\text{-}Lys)_m \qquad (2)$$

Wegen der Gefahr eines Einflusses der polymeren. peptidartigen Flankengruppen, die auch hinsichtlich der spektroskopischen Untersuchungen ungünstig waren, versuchten Goodman et al. die Polypeptidblöcke durch niedermolekulare, nicht peptidartige solubilisierende Schutzgruppen zu ersetzen (81,82). Dazu wurden folgende Gruppen verwendet:

$$CH_3\text{-}O\text{-}(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_2CH_2\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}OH \qquad (3)$$

(4)

Diese Schutzgruppen wurden nachträglich am C- bzw. N-Terminus des Peptids fixiert. Auf diese Weise gelang es $(Ala)_n$ bis zu n=9 zu solubilisieren und spektroskopisch durch Messung des Zirkulardichroismus (CD) zu untersuchen. Obwohl die solubilisierenden Schutzgruppen (3) und (4) gegenüber (1) und (2) eindeutige Vorteile besitzen, hat diese Methode zur Solubilisierung von schwerlöslichen Peptiden keine weitere Anwendung gefunden. Der Grund liegt zweifellos im enormen präparativen Aufwand: Zunächst bereitet die Synthese der Oligomere ohne solubilisierende Schutzgruppen außergewöhnliche Schwierigkeiten. Die nachträgliche Einführung von (3) bzw. (4) in die fast unlöslichen Oligomere verläuft mit äußerst geringen Ausbeuten.

Hinzu kommt der Nachteil, daß auf diese Weise nur beidseitig blockierte Oligomere studiert werden können. Dies kann gerade im niedermolekularen Bereich der Oligopeptide von eintscheidender Bedeutung für die Ausbildung einer Sekundärstruktur sein. Es gibt Hinweise, daß vor allem das Aminoende einen starken Einfluß auf die Stabilität einer Sekundärstruktur ausübt (82). Deshalb wäre es wünschenswert, Peptide mit und ohne Aminoschutzgruppen untersuchen zu können.
Diese Möglichkeit ergibt sich bei Peptiden, die nach der LPM synthetisiert werden. Diese können vor und nach der Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe ohne weitere Vorbehandlung direkt einer CD-Messung zugeführt werden.

2.3. Konformationsanalyse PEG-gebundener Peptide

Konformationsstudien von synthetischen Peptiden sind vor allem in Lösung von großem Interesse, da sie Rückschlüsse zulassen über den Zusammenhang zwischen biologischem Wirkungsmechanismus und der Konformation des biologisch aktiven Peptids. Die Untersuchungen an Modellpeptiden werden dabei sowohl in organischem Medium als auch in Wasser durchgeführt. Das organische Lösungsmittel imitiert dabei eine hydrophobe Umgebung des Peptids, die im biologischen System (z.B. in der Zellmembran) oder im Innern eines Proteins selbst (z.B. in der hydrophoben Tasche des Myoglobins) gegeben sein kann. Die wässerige Umgebung ist das Lösungsmittel, in dem die Proteine ihre biologische Aktivität ausüben. Der Einfluß des Lösungsmittels auf die Konformation eines Peptids ist inzwischen an vielen Beispeilen demonstriet worden. Da nur wenige Peptide das für Konformationsuntersuchungen erforderliche Löslichkeitsverhalten zeigen, bietet die direkte Konformationsanalyse PEG-gebundener und damit solubilisierter Peptide große Vorteile:

- Die synthetischen Peptide können wegen der guten Löslichkeit von PEG in einer Vielzahl von Lösungsmitteln - z.B. TFE, Dioxan, $CHCl_3$, H_2O - untersucht werden.
- Durch den schnellen stufenweisen Aufbau nach der LPM können in kurzer Zeit eine Vielzahl von Modellpeptiden bzw. Peptidanalogen synthetisiert und ohne zusätzlichen Syntheseaufwand vermessen werden.
- Der Zusammenhang zwischen Kettenlänge, Schutzgruppen, Lösungsmittel, Primärsequenz und der Konformation kann systematisch untersucht werden.

2.4. Konformationsuntersuchungen mit CD

Einen linear polarisierten Lichtstrahl kann man sich aus zwei entgegengesetzt zirkular polarisierten Lichtstrahlen vorstellen. In einer optisch aktiven Substanz wird der eine Strahl stärker abgelenkt als der andere. Im Bereich von Absorptionsbanden werden im allgemeinen die entgegengesetzt zirkular polarisierten Strahlen verschieden stark absorbiert. Man bezeichnet beide Effekte zusammen als Zirkulardichroismus. Die Differenz zwischen den Intensitäten des rechts- und linkspolarisierten Strahls kann gemessen werden: $D = D_l - D_r$.

Aus ΔD, der Konzentration c und der Schichtdicke d läßt sich der molare CD $\Delta\varepsilon$ berechnen:

$$\Delta\varepsilon = \frac{\Delta D}{c.d}$$

Durch die unterschiedliche Absorption sind die Lichtvektoren nach Verlassen der Küvette nicht mehr gleich lang. Die Spitze des Summenvektors beschreibt daher eine Ellipse. Man kann den CD auch als Elliptizität Θ ausdrücken. Der Zusammenhang von Θ mit $\Delta\varepsilon$ ist:

$$\Theta = 2.303 \frac{4500}{\pi} \Delta\varepsilon = 3298\,\Delta\varepsilon \approx 3300\,\Delta\varepsilon$$

Die Einheit von Θ ist (grad.cm²/Dezimol)
In dieser Arbeit wird $\Theta_{\overline{M}}$ verwendet. Dies ist die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest.
Peptide geben je nach Ordnungsgrad chrakteristische CD-Kurven. So erhält man für das ungeordnete Peptid, die ß-Struktur und die α-Helix in Form und Länge unterschiedliche Standardkurven. Der Ordnungsgehalt eines Peptids kann durch Vergleich der experimentellen CD-Kurve mit den Standardkurven bestimmt werden.

2.5. IR-Untersuchungen im Festzustand

Aus einem Vergleich der Konformationen eines Peptids in Lösung und im Festzustand können wertvolle Rückschlüsse über die Bedeutung der intermolekularen Kräfte gegenüber denen in Lösung dominierenden intramolekularen Kräften für die Konformation einer Peptidkette gewonnen werden. So ist heute die Frage noch ungeklärt, ob sich die Konformation eines Proteins beim Übergang in den Festzustand verändert. Aus den Vibrationsbanden der Amidbindungen im IR-Spektrum lassen sich wesentliche Informationen über die Konformation eines Peptids ableiten: Vor allem die Banden bei 1720 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} (Amid I Bande) und bei 750 cm^{-1} - 600 cm^{-1} (Amid V Bande) stellen sich als äußerst empfindlich gegenüber Änderungen der Konformation des Peptids heraus.
Die Absorptionsbanden bei 1655 cm^{-1} und 650 cm^{-1} deuten auf eine ungeordnete Struktur. Die Absorptionsbanden bei 1635 cm^{-1} und 710 cm^{-1} charakterisieren die ß-Struktur. Die α-Helix Struktur ist charakterisiert, wenn die Banden von Amid-I und Amid-V bei 1650 cm^{-1} und 615 cm^{-1} vorhanden sind.

2.6. Distanzmessungen durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie

2.6.1. Allgemeines zur Methode

Die Bestimmung des strahlungslosen Energieübergangs zwischen 2 Chromophoren durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie kann zur Bestimmung von Moleküldimensionen, d.h. intramolekularen Abständen zwischen chromophoren Gruppen herangezogen werden (83,84). Bei synthetischen Peptiden können geeignete Chromophore in die Kette eingebaut werden, so daß aus der Messung intramolekularer Abstände im Molekül auf die Flexibilität bzw. das Vorliegen geordneter Strukturen geschlossen werden kann. Die Methode ist vor allem bei kurzkettigen Peptiden sehr wertvoll, bei denen die sonst angewendeten Methoden zur Konformationsuntersuchung wie Messung des CD oder NMR-Spektroskopie wegen Endgruppeneffekten häufig schwierig zu interpretieren sind und das Molekulargewicht für die Anwendung von Lichtstreuung und Viskositätsmessungen zur Bestimmung von Moleküldimensionen zu klein ist.
So wurden 1969 von Eisinger die Dimensionen von ACTH-Sequenzen mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Methoden, bzw. des dadurch bestimmten Energie-Transfers untersucht (85,86). Die hier untersuchten Sequenzen enthalten einen Tyrosinrest in Position 1 und einen Tryptophanrest in Endposition. Da die Abstände zwischen den Chromophoren Tyr und Trp konformationsabhängig sind, können daraus Rückschlüsse auf die Konformation gezogen werden.
Voraussetzung für die Anwendung fluoreszenzspektroskopischer Methoden zur Bestimmung intramolekularer Abstände ist das Vorhandensein von 2 chromophoren Gruppen, wobei das Emissionsspektrum der einen Gruppe (Donor) mit dem Absorptionsspektrum der anderen Gruppe (Akzeptor) überlappen muß.
Die exakte Theorie des Resonanztransfers von elektronischer Anregungsenergie zwischen isolierten Donor- und Akzeptormolekülen mit geeigneten spektroskopischen Charakteristiken

wurde von Th. Förster bereits 1948 erarbeitet (83). Die Theorie wurde zunächst mit Erfolg auf das Phänomen der Fluoreszenzlöschung der Donorfluoreszenz in Lösung von Donor- und Akzeptorfarbstoffmolekülen angewandt. Später konnte die vorausgesagte Abhängigkeit der Transferate von r^{-6} (r=intramolekulare Donor-Akzeptor-Distanz) in mehreren Laboratorien nachgewiesen werden (87,88,89). Von diesem Zeitpunkt an fand die Methode immer häufiger Anwendung zur Bestimmung intramolekularer Abstände in der Größenordnung von 10-60 A° bei Biopolymeren (90,91,92,93).

2.6.2. Prinzip der Methode

Ein elektronisch angeregter Chromophor kann außer durch Emission eines Lichtquants oder durch strahlungslosen Mechanismus auf ein benachbartes Chromophor übertragen. Der angeregte Akzeptor gibt nun im günstigsten Falle die übertragene Energie teilweise als messbare Fluoreszenzstrahlung ab, deren Intensität ein Maß für den erfolgten Energietransfer und für die Distanz zwischen Donor und Akzeptor ist. Der Vorgang des Energietransfers konkurriert direkt mit den anderen Desaktivierungsprozessen wie Emission und strahlungslose Desaktivierung. Die dazugehörige Geschwindigkeitskonstante ist folgendermaßen definiert:

$$K_T = \frac{1}{\tau D} \left(\frac{R}{R^\circ} \right)^6$$

mit τ_D^{-1} = Inverses der Lebensdauer des angeregten Zustandes (= Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller Desaktivierungsprozesse in Abwesenheit eines Akzeptors).

R = Distanz zwischen Donor und Akzeptor

R°= Försters-Distanz = Abstand bei dem 50 % Energietransfer stattfindet.

Die Energietransferrate, bzw. die "transfer efficiency" ist definiert als:

$$T = \frac{K_T}{\tau_D^{-1} + K_T} = \frac{R_o^6}{R_o^6 + R^6}$$

mit $R_o^6 = 8.785 \times 10^{-25} \cdot K^2 \cdot \phi_D \cdot n^{-4} \cdot J(\bar{\nu})$

wobei ϕ_D = Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,

n = Brechungsindex des Mediums,

$J(\bar{\nu})$ = Überlappungsintegral des normalisierten Emissionsspektrums des Donors mit Absorptionsspektrum des Akzeptors,

K^2 = Orientierungsfaktor für die Dipol-Dipol-Wechselwirkung

sind.

K^2 drückt den Einfluß der gegenseitigen Orientierung von Donor, Akzeptor und vom Abstandsvektor zwischen den beiden auf die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers aus. Wie aus der Definition von K^2 hervorgeht (70), kann K^2 Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Bei gleicher Wahrscheinlichkeit und Vorkommen aller Orientierungen ergibt sich als Durchschnittswert für $\langle K^2 \rangle$ 2/3. Diese Größe enthält einige Problematik, da über ihren genauen Wert im allgemeinen nichts bekannt ist. Meistens wird argumentiert, daß zwischen den Chromophoren eine genügend große Zahl mehr oder weniger frei rotierbarer Bindungen liege, die eine Zufallsorientierung der Übergangsmomente der Chromophoren gewährleisten. Bisher wurde diese Annahme bei der Bestimmung des Energietransfers als gegeben vorausgesetzt.

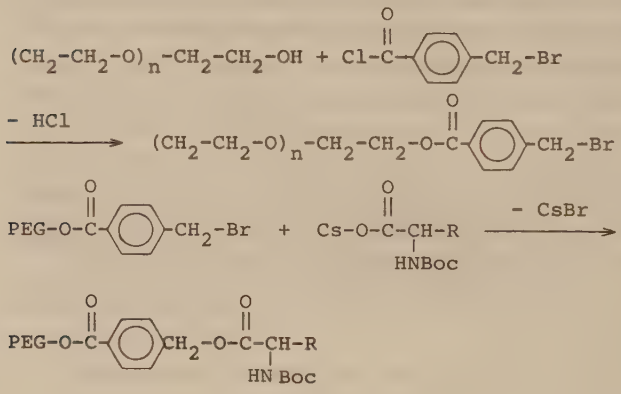
3. Synthese eines Modelltetrapeptids zu Konformationsuntersuchungen

3.1. Synthese des Tetrapeptids Boc-Val-Pro-Gly-Gly-OH nach zwei Varianten

Die Synthese des Tetrapeptids Boc-Val-Pro-Gly-Gly-OH wurde am polymeren Träger Polyäthylenglykol (6000, 3000) durchgeführt. Bei Synthese (1) wurde PEG (6000) mit dem Bromobenzylanker verestert, bei Synthese (2) wurde Polyäthylenglykol 3000 direkt mit Boc-Gly verestert.

3.1. Synthese am Benzylanker-Träger und ausschließende hydrogenolytische Abspaltung

Bei dieser Synthese wurde die C-terminale Aminosäure über eine Benzylesterverbindung mit dem polymeren Träger PEG verknüpft. Dadurch kann man nach beendeter Synthese das Peptid durch Hydrierung vom Polymer abgespalten. Das modifizierte PEG (MG 6000) läßt sich nach H. Albrecht (39) aus PEG (6000) und p-Brommethylbenzoylchlorid darstellen (Abb. 1).



Das entstandene Bis-(P-Brommethylbenzoyl)-polyäthylenglykol wird mit dem Caesiumsalz der gewünschten Boc-Aminosäure in Dimethylformamid zum entsprechenden Aminosäurebenzylester umgesetzt. An diese erste Aminosäure läßt sich das Peptid nach den üblichen Methoden weiter aufbauen. Als Carboxylschutzgruppe wurde Bis-(P-Brommethylbenzoyl)-polyäthylenglykol MG 6000 mit Boc-Glycin verestert. Gekuppelt wurde mit den symmetrischen Anhydriden der Boc-Aminosäure, welche separat mit Dicyclohexylcarbodiimid in Methylenchlorid dargestellt wurden. Als direkte Umsatzkontrolle dient der quantitative Stein-Moor-Test. Die Aminoschutzgruppe wurde in TFA/CH_2Cl_2 (1:1) abgespalten. Während der Synthese traten keine Löslichkeitsschwierigkeiten auf. Die Kupplungsausbeuten waren nach Fluramtest und Aminosäureanalyse nahezu quantitativ. Die Gesamtausbeute an Polymerpeptid bezogen auf das eingesetzte Polymer betrug 96 %.
Die Aminosäureanalyse des Polymertetrapeptids ergab:
Hydrolyse: 6n HCl, 72 h, 110° C

gef.:	Gly 2.03	Pro 1	Val 1.07
theor.:	Gly 2	Pro 1	Val 1

3.1.1. Abspaltung und Charakterisierung des Peptids

Zur Spaltung der Polymer-Benzylester-Bindung wird das Peptid in einer Lösung von Methanol/Essigsäure im Verhältnis 1:1 mit dem Katalysator Palladium/Tierkohle in einem Autoklaven bei 50 bar innerhalb von 12 Stunden unter Rühren hydriert. Die Hydrolyse mit heterogenen Katalysatoren erbringt eine 96 %-ige Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger. Die Beladung wird mit der Aminosäureanalyse bestimmt.
Beladung vor der Abspaltung: 77.4 %
Beladung nach der Abspaltung: 2.1 %

Die Aminosäureanalyse des Peptids zeigt gute Werte.
Hydrolyse: 6n HCl 110°C 72 h

theor.:	Gly	2	Pro	1	Val	1
gef.:	Gly	2	Pro	1.1	Val	1.1

3.2. Synthese über aliphatische PEG-Verknüpfung mit alkalischer Abspaltung

Als polymerer Träger wird Polyäthylenglykol vom Molekulargewicht 3000 gewählt. Das käufliche PEG wird mehrmals in reinem Ethanol umgefällt. Danach wird am Hochvakuum gut getrocknet.
Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit dem löslichen Träger wird mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) durchgeführt. Die N-geschützte Aminosäure (Glycin) wird in der Kälte (0°C) mit DCC zum symmetrischen Anhydrid voraktiviert, wobei Dicyclohexylharnstoff ausfällt, der leicht zu entfernen ist.
Unterdessen wird das Polymer in Methylenchlorid aufgenommen (10%-ige Lösung), mit etwas Pyridin (Katalysator) versetzt und die voraktivierte Aminosäure hinzugegeben (5-facher Überschuß an Anhydrid). Die Lösung wird stark eingeengt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird der PEG-Ester mit Äther ausgefällt.

Die Kupplungen von Boc-Gly, Boc-Pro, Boc-Val werden mit den symmetrischen Anhydriden der Aminosäuren in Dichlormethan durchgeführt. Nach jeder Kupplung wird das Methylenchlorid am Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Äthanol aufgenommen und anschließend mit Äther ausgefällt. Die Darstellung aller Anhydride erfolgt mit Dicyclohexylcarbodiimid in Methylenchlorid. Die Kupplungsausbeute wurde mit Hilfe des Fluramtests ermittelt. Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe erfolgte in Trifluoressigsäure/ Methylenchlorid (1:1).

Die Aminosäureanalyse des Polymerpeptids ergab folgende Werte:
Hydrolyse: 6n HCl, 110°C, 72 h

theor.:	Gly	2	Pro	1	Val 1
gef.:	Gly	1.8	Pro	1	Val 1.04

3.2.1. Alkalische Abspaltung vom polymeren Träger

Die Abspaltung des synthetisierten Tetrapeptids vom löslichen Träger geschieht durch alkalische Hydrolyse. Die Hydrolyse erfolgt mit 1n KOH/Dioxan. Nach 8 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung mit 1n HCl neutralisiert. Das wasserunlösliche Peptid wird abzentrifugiert. Der lösliche Träger wird mit Chloroform extrahiert und die verbliebene Beladung mit der Aminosäureanalyse bestimmt. Die alkalische Hydrolyse ergibt eine 92.7 %-ige Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger.
Beladung vor der Abspaltung: 83.3 %
Beladung nach der Abspaltung: 6.1 %

Die Aminosäureanalyse des Peptids zeigt die folgenden Werte:
Hydrolyse: 6n HCl, 110° C, 72 h

theor.:	Gly	2	Pro	1	Val 1
gef.:	Gly	2	Pro	0.9	Val 0.95

3.3. Konformationsuntersuchungen des Tetrapeptids

3.3.1. Konformationsuntersuchungen mit CD

a) Einführung (94)

An Hand des Tetrapeptides Boc-Val-Pro-Gly-Gly-OH sollen Konformationsuntersuchungen durchgeführt werden. Dazu wird am Polyethylenglykol (PEG) bzw. PEG mit einer Ankergruppe (*P*-Brommethylbenzoesäurechlorid) das Tetrapeptid nach der Liquid-Phase-Peptidsynthese stufenweise aufgebaut. Das freie Peptid wird durch alkalische Hydrolyse

bzw. katalytische Hydrierung vom Polymer abgespalten. Um nun einen Einfluß des PEG auf die Konformation des Tetrapeptids nachzuweisen, werden die CD-Spektren der PEG-Peptide mit denen der abgespaltenen Peptide verglichen.

b) Messungen

Die CD-Spektren wurden am Spektrometer Modell CD 185 Jouan aufgenommen, wobei die Peptid-Konzentration 1 mg Peptid pro ml Lösungsmittel betrug. Als Lösungsmittel diente Trifluorethanol (TFE). Die Schichtdicke der Küvetten bewegte sich in den Grenzen von 0.1 - 0.2 mm.

c) Ergebnisse und Diskussion

In der folgenden Tabelle (2) sind die aus den CD-Spektren erhaltenen Werte von:

Boc-Val-Pro-Gly-Gly-O-Anker-PEG_{6000} I
Boc-Val-Pro-Gly-Gly-O-PEG_{3000} II
Boc-Val-Pro-Gly-Gly-OH III (a+b)
in TFE dargestellt.

Tabelle 2:

Peptid	n-π^*-Übergang in nm	x 10^3	π-π^* Übergang in nm	x 10^3	Nulldurchgang in nm
I	226	- 29	200	+ 100	214
II	226	- 23	200	+ 87	216
IIIa	220	- 30	199	+ 126	210.2
IIIb	219	- 29	200	+ 102	209.4

IIIa: Boc-Val-Pro-Gly-Gly-OH (Hydrierung)
IIIb: Boc-Val-Pro-Gly-Gly-OH (alk. Hydrolyse)

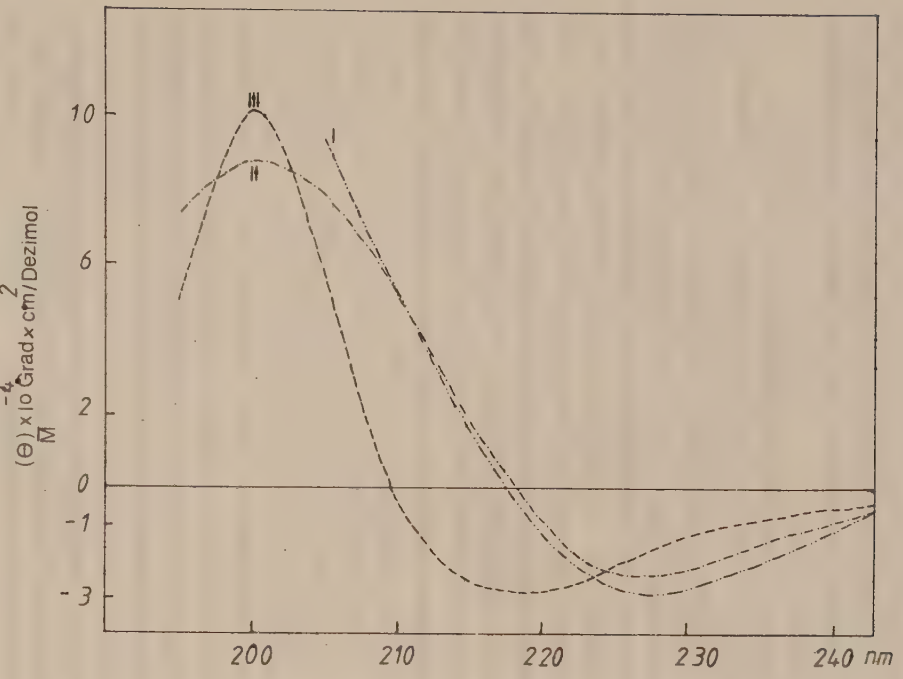


Abbildung 2: CD-Spektren von Boc-Val-Pro-Gly-Gly-PEG_6(I), Boc-Val-Pro-Gly-Gly-PEG_3(II) und Boc-Val-Pro-Gly-Gly-H(III a,b) (c= 1 mg Peptid/ml in TFE)

Aus Tabelle 2 können folgende Daten entnommen werden:
Der n- π^* Übergang erscheint bei 219-226 nm und entspricht dem (-) Cotton-Effekt. Das Minimum hat einen Θ_M-Wert von - (23-30 x 10^3).
Der π - π^* Übergang erscheint bei 200 nm und wird dem (+) Cotton-Effekt zugeordnet. Das Maximum hat einen Θ_M-Wert von (87-120 x 10^3).
Schließlich liegt der Nulldurchgang bei 209-216 nm (Abb. 2).

Der negative Cotton-Effekt ist gegenüber dem Spektrum der ß-Konformation gegen längere Wellenlängen verschoben. Darüberhinaus ist die Ausbildung einer ß-Struktur bei einer Kettenlänge von 4 As auszuschließen. Somit sprechen die CD-Kurven eindeutig für das Vorliegen eines ß-turn. Die Verschiebung der PEG-gebundenen Peptide (I und II) gegenüber den freien Peptiden (III a,b) deutet auf einen Einfluß der PEG-Kette hin.

Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit denen von W. Woody et al. (95) überein.

3.3.3. Konformationsuntersuchungen mittels IR-Spektroskopie

a) Einführung

Die IR-Spektroskopie dient in jüngster Zeit neben CD-Untersuchungen auch zur Konformationsanalyse von Peptiden und PEG-gebundenen Peptiden (96). Die durch das PEG hervorgerufene Absorptionsbande im Bereich von 1100 cm^{-1} (97) stört dabei nicht, da sie mit den für die Strukturuntersuchung interessanten Regionen der Amidbanden A, I, II und V nicht interferiert.

b) Aufnahme der Spektren

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem IR-Spektrographen, Modell Infracord, Firma Perkin Elmer. Da die Sbustanzen nur schwer löslich waren, wurden sie im Fest-

zustand in Form von KBr-Presslingen vermessen (1.5 mg Substanz verrieben in 300 mg KBr).
Von folgenden Proben wurden IR-Spektren aufgenommen:

Boc-Val-Pro-Gly-Gly-PEG_6 (I)
Boc-Val-Pro-Gly-Gly-PEG_3 (II)
Boc-Val-Pro-Gly-Gly-OH (III)

c) Ergebnisse und Diskussion

Die charakteristischen Banden, die das Vorliegen einer ß-Struktur anzeigen, liegen in folgenden Frequenzbereichen (96)

3280 - 3260 cm^{-1} = Amide-A
1635 - 1624 cm^{-1} = Amide-I
720 - 705 cm^{-1} = Amide-V

Es hat sich bei Konformationsstudien an Oligopeptiden im Festzustand gezeigt, daß die Absorptionsbanden von Amid-I und Amid-V gegenüber Änderungen der Konformation innerhalb der Peptidkette besonders empfindlich sind (98).
In Abbildung 3 sind die Absorptionsspektren der drei Proben in den jeweiligen Bereichen zusammengestellt.

Die starken Absorptionsbanden bei 1635 cm^{-1} (Amid I) und bei 720 cm^{-1} (Amid V) dueten auf das Vorliegen einer ß-Struktur hin. Die schwache Bande bei 1690 cm^{-1} kann für die CO-Streck-Schwingung, hervorgerufen durch die Urethanbindung der Boc-Schutzgruppe, verantwortlich sein (99). Allerdings nimmt die Intensität dieser Bande (von I bis III) stark ab.
Die ungewöhnlich starke Schulter bei 1650 cm^{-1} in den Spektren aller drei Peptide (im α-Helix Bereich) läßt sich durch die Anwesenheit eines ß-turn interpretieren (100). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den durch CD-Untersuchungen erhaltenen Befunden. Der Einfluß der ß-turns auf die IR-Spektren der Peptide ist bei polymergebundenen Peptiden deutlicher als bei den niedermolekularen Peptiden.

Zusammenfassend beweisen die CD- und IR-Daten das Vorhandensein eines ß-turn; dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit theoretischen Vorhersagen (101) (Tabelle 3).

In Tabelle 3 sind die Helix, ß-Struktur und "ß-turn"-Potentiale P_α , P_β und P_t der 7 natürlich vorkommenden Aminosäuren mit folgender Klassifizierung angeordnet.

h_α = Helixbildner I_α = schwacher Helixbildner
b_α = Helixbrecher B_α = starker Helixbrecher

Tabelle 3: P_α-, P_β- und P_t-Werte der 7 natürlich vorkommenden Aminosäuren (101)

As	P_α		As	P_β		As	P_t
Met	1.20	h_α	Met	1.67	H_β	Gly	1.68
Trp	1.14		Val	1.65		Pro	1.54
Val	1.14		Ile	1.60		Tyr	1.25
Ile	1.00	I_α	Tyr	1.29	h_β	Trp	1.11
			Trp	1.19		Met	0.67
Tyr	0.61	b_α					
			Gly	6.81	i_β	Ile	0.58
Pro	0.59	B_α	Pro	0.62	b_β	Val	0.3
Gly	0.53						

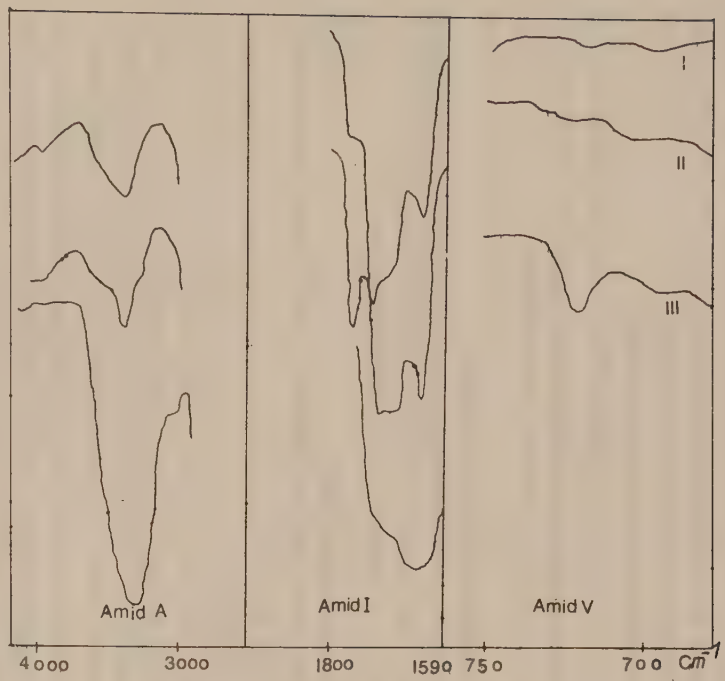


Abbildung 3: IR-Absorptionsbanden von Boc-Val-Pro-Gly-Gly-PEG_6(I), Boc-Val-Pro-Gly-Gly-PEG_3(II) und Boc-Val-Pro-Gly-Gly-H(III) im Amid-A-, Amid-I- und Amid-V-Bereich

4. Synthese von Modell-hexapeptiden zur Konformationsuntersuchung

4.1. Synthese der Modellpeptide

Mit dem Ziel von Konformationsuntersuchungen mittels IR-, CD-Spektroskopie und zur Bestimmung interamolekularer Abstände durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie wurden folgende Peptide synthetisiert:

Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEG_5
Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEG_5
Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEG_5

Die Synthesen in dieser Arbeit werden nach folgenden allgemeinen Gesichtspunkten durchgeführt.

1) Abspaltung der Schutzgruppe
Es wird nur die Boc-Gruppe als N-terminaler Schutz angewandt, die acidolytisch mit TFA/Methylenchlorid (1:1) während 30 Minuten lang abgespalten wird.

2) Beladungsbestimmung
Die Beladung des Polymerpeptids wird durch Aminosäureanalyse bestimmt.

3) Kupplung
Das Polymerpeptid wird in Methylenchlorid gelöst (10%-ige Lösung) und mit der voraktivierten Aminosäure (5-facher Überschuß an Anhydrid) versetzt. Dann wird mit der berechneten Menge N-Methylmorpholin neutralisiert, damit die Deprotonierung der Aminogruppe erfolgen kann.
Die Kupplungsdauer wird je Aminosäure frei variiert und erstreckt sich zwischen 2-4 Stunden.

4) Entfernen der Überschüsse
Die Entfernung der Überschüsse erfolgt durch einfaches Umfällen mit Ethanol/Diethylether und DMF/Diethylether, bis die Dünnschichtchromatographie ein sauberes Produkt anzeigt.

5) Umsatztest

Der Umsatz wird mit dem Fluram- und Stein-Moore-Test, bzw. Aminosäureanalyse quantitativ kontrolliert.
Die Aminosäureanalyse der Polymerpeptide ergaben:
Hydrolyse: 6n HCL 110°C 24h

1-Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEG_5

	Tyr	Ile	Pro	Gly	Trp*
theor.:	1	2	1	1	1
gef.:	0.81	1.7	0.91	1	0.78

2-Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEG_5

	Tyr	Ile	Pro	Gly	Trp
theor.:	1	2	1	1	1
gef.:	0.81	1.8	1.2	1	0.73

3-Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEG_5

	Tyr	Ile	Pro	Aib	Trp
theor.:	1	2	1	1	1
gef.:	0.8	1.63	0.85	0.04	1

* Die Konzentration von Trp wurde durch Fluoreszenzspektroskopie bestimmt.

4.2. Konformationsuntersuchungen der Hexapeptide durch CD-Messungen

Anhand der folgenden Hexapeptide

a) Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEGM (PEGM Mol.Gew. 5000)
b) Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEGM
c) Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEGM

sollen Konformationsuntersuchungen durchgeführt werden. Die Messungen werden in Wasser und in TFE durchgeführt (Durchführung der Messungen und Messbedingungen siehe Kap. 3.3.1.).

a) Konformationsuntersuchungen mit CD in TFE

Kurve a und b in Abbildung (4) deuten auf überwiegende random-coil Konformation hin. Geringe Anteile von assoziierter Struktur sind nicht auszuschließen.

Peptid C dagegen besitzt ein ähnliches CD-Spektrum wie das einer ß-Konformation. Die Anwesenheit eines Aib-Restes schließt jedoch aus sterischen Gründen diese Konformation aus. Der negative Cottoneffekt bei ca. 220 nm läßt sich demnach nur durch das Vorliegen eines ß-turn erklären.

Die CD-Untersuchungen der Hexapeptide ergeben, daß im Falle der Sequenzen a und b Mischungen aus random-coil und ß-Struktur vorliegen, während Peptid C einen ß-turn ausbildet. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit empirischen Konformationsvorhersagen. (Tabelle 3)

b) Die CD-Untersuchungen in Wasser

Durch Aufnahme von CD-Spektren der Hexapeptide in Wasser bei 25° C und 70° C wurde ihre Konformation untersucht (Abb. 5). Peptid (a) zeigt beim Wechsel von TFE zu H_2O einen deutlichen Konformationsübergang. Die CD-Daten von Peptid (a) in Wasser deuten eine ß-Struktur an. ((-) Cottoneffekt bei 217.5 nm und Nulldurchgang bei 207 nm für 25° C und bei 200 nm für 70° C). Allerdings ist aus dem CD-Spektrum das Vorliegen eines ß-turn nicht auszuschließen.

Das CD-Spektrum von Peptid (b) zeigt in Wasser wie auch TFE einen ähnlichen Verlauf ((-) Cottoneffekt bei 210 nm und 200 nm). Bei 70° C erscheint bei 205 nm eine zusätzliche Bande.
Die Daten von Peptid (b) deuten auf eine Mischung von ungeordneter und ß-Struktur hin.

Bei Peptid (c) sind die CD-Kurven in Wasser und in TFE weitgehend identisch und lassen auf das Vorliegen eines ß-turn schließen ((-) Cottoneffekt bei 217.5 nm und Nulldurchgang bei 207 nm).

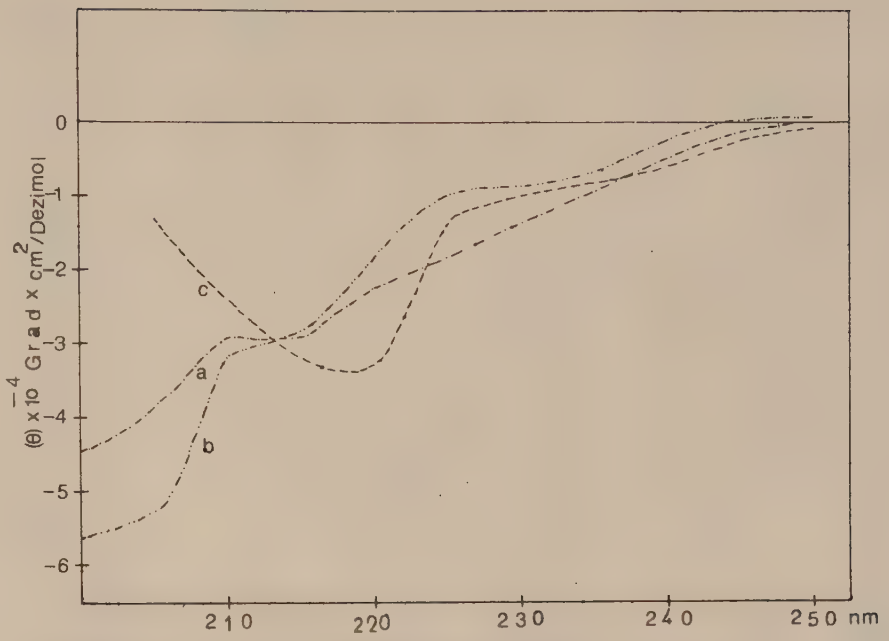


Abbildung 4: CD-Spektren von Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEG (a), Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEG (b) und Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr -PEG (c)
(c = 1 mg Peptid/ml in TFE)

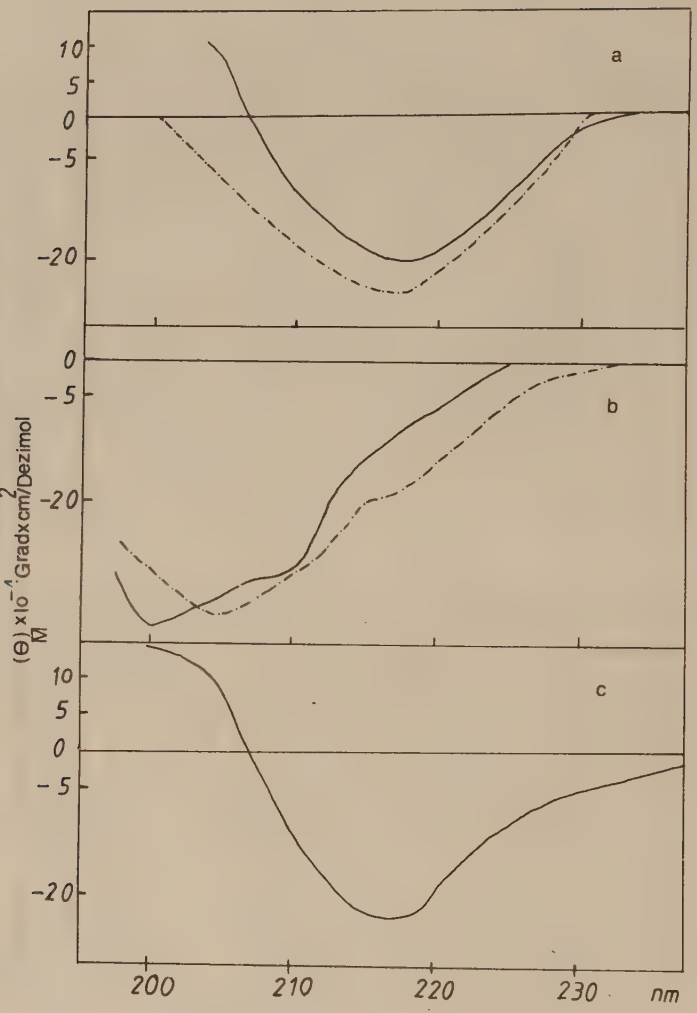


Abbildung 5: CD-Spektren von
Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEG (a)
Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEG (b)
Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEG (c) in H_2O
c = 1 mg Peptid/ml
——— bei 27° C .-.-.-.-.- bei 70° C

4.3. Konformationsuntersuchungen von Hexapeptiden mit IR im Festzustand

Tabelle 4 zeigt die Absorptionsfrequenzen der Hexapeptide

a) Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEGM
b) Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEGM
c) Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEGM

für Amid A-, I-, V-Bereiche im Festzustand.

Tabelle 4:

Peptide	Amid V 600-750 cm^{-1}	Amid I 1600-1750 cm^{-1}	Amid A 3200-3700 cm^{-1}
a) Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEGM	695 (M) / 745 (S)	1635 (sh) / 1662 (V.S)	3320 (S) / 3442 (sh)
b) Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEGM	745 (W)	1662 (V.S) / 1642 (V.S)	3320 (S) / 3442 (sh)
c) Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEGM	695 (M) / 745 (S)	1635 (sh) / 1655 (V.S)	3250 (S)

S = stark W = schwach V.S = sehr stark M = mittel
sh = Schulter

Die IR-Daten aller drei Hexapeptide zeigen, daß die Hexapeptide im Festzustand eine Mischung von ungeordneter Konformation und ß-Struktur haben (Aufspaltung der Amid-I-Bande). Das Vorliegen eines ß-turn, wie es für Peptid C erwartet werden muß, läßt sich aus den IR-Daten nicht eindeutig erkennen.
Für die Schulter bei ca. 1700 cm^{-1} kann die CO-Streckschwingung, hervorgerufen durch die Urethanbildung der Boc-Schutzgruppe, verantwortlich sein (99).

Die Bande im Bereich von 600-700 cm^{-1} könnte entweder durch die Aromatenschwingung des Tyrosins hervorgerufen werden oder auf eine ß-Struktur hinweisen.

4.4. Distanzmessungen von Hexapeptiden durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie

a. Einleitung

Da es bis heute keine Methode gibt, mit der die Konformation eines Peptids in Lösung direkt ermittelt werden kann, ist man auf eine Kombination verschiedener spektroskopischer Methoden angewiesen. Die heute am häufigsten angewandten Untersuchungsmethoden sind die Messung des Zirkulardichroismus (CD) und die IR-Spektroskopie.

Neben diesen beiden Methoden werden hier Konformationsuntersuchungen erstmals durch Distanzmessungen mittels Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie durchgeführt.
Die hier untersuchten Sequenzen enthalten einen Tyrosinrest in C-terminaler bzw. einen Tryptophanrest in N-terminaler Position. Da die Abstände zwischen den Chromophoren Tyr und Trp konformationsabhängig sind, können daraus Rückschlüsse auf die Konformation gezogen werden (88, 102, 103,104).

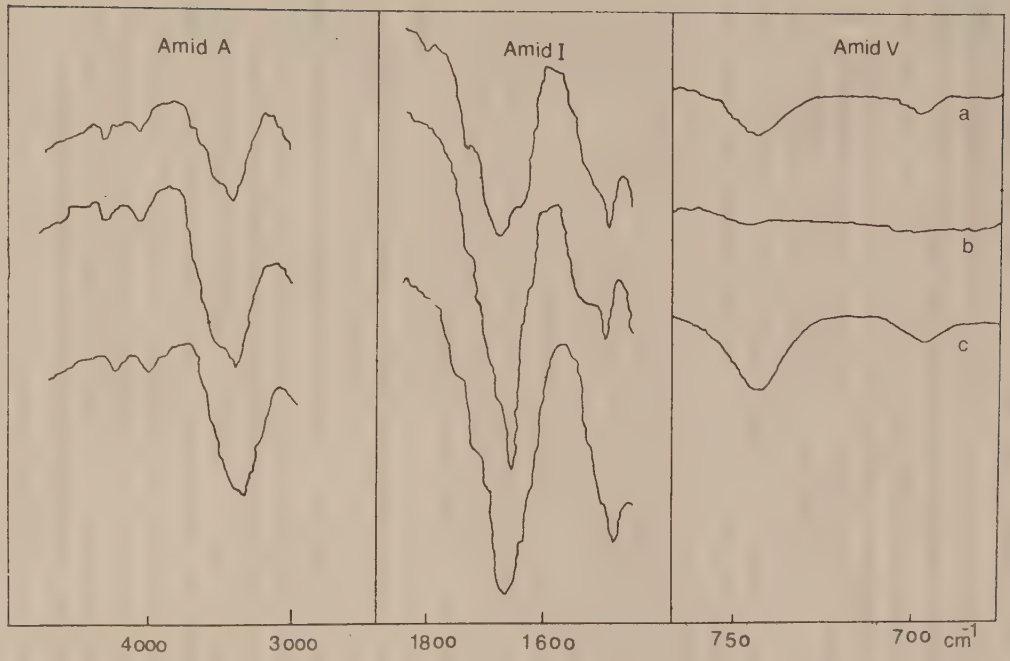


Abbildung 6: IR Absorptionsbanden von Boc-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEG (a), Boc-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEG (b) und Boc-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEG (c) im Amid-A, Amid I und Amid-V Bereich.

b. Experimenteller Teil

Die Energietransferrate E wurde aus dem "Quenching" der Donor-Fluoreszenz und dem relativen Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenz bestimmt.
Der Zusammenhang zwischen Φ_D & Φ_D^o, der Donorquantenausbeute in Anwesenheit und Abwesenheit des Akzeptors und der Energietransferrate E zeigt folgende Gleichung:

$$E = (1 - \Phi_D / \Phi_D^o)$$

Die Transferenergierate wurde wie folgt bestimmt:

a) Die Fluoreszenz von Tyr und Trp gebundenen Peptiden wurde bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm aufgenommen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren sowohl der Donor als auch der Akzeptor (Abb. 7, Kurve I).
b) Ebenso wurde die Fluoreszenz dieser Peptide bei einer Anregungswellenlänge von 293 nm gemessen. Hierbei absorbiert nur das Akzeptormolekül (Abb. 7, Kurve II).
c) Für Peptide, die nur den Donor Tyr enthielten, wurde das Emissionsspektrum nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 270 nm aufgenommen (Abb. 7, Kurve III).
d) Kurve IV in Abb. 7 zeigt das Ergebnis nach Normalisierung der Fluoreszenzspektren I und II bei 360 nm. Bei dieser Wellenlänge emittiert der Donor nicht mehr.
e) Anschließend wurde das normalisierte Spektrum IV vom Spektrum I subtrahiert. Man erhält Kurve V, sie zeigt die vom Donor beim Akzeptor induzierte Fluoreszenz.
f) Die Werte für das Überlappungsintegral J, den Orientierungsfaktor für die Dipol-Dipol-Wechselwirkung K^2 und den Brechungsindex n des Mediums wurden von Eisinger (85) übernommen.

$J = 4.8 \times 10^{-16}\ M^{-1}/cm^6$

$K^2 = 2/3$

$n = 1.5$

Als Lösungsmittel wurde bei allen Messungen Wasser verwendet. Die Konzentration betrug 5×10^{-5} Mol/l.

Aus a) - f) kann man die intramolekularen Abstände zwischen Tyr und Trp bestimmen und folglich die Länge des Peptides.

c. Ergebnisse und Diskussion

In der folgenden Studie wurden zwei Reihen von Oligopeptiden dargestellt: eines hatte Tyr und Trp an den beiden Enden, am anderen ist nur Tyr an einem Ende gebunden. Die hier untersuchten Peptide enthalten Gly-Pro- oder Aib-Pro-Sequenzen in den Positionen i+1 und i+2, weil bei Vorliegen dieser Sequenzen eine große Tendenz zur Ausbildung von ß-turns erwartet wird (101). Die Energietransferrate E wurde nach der oben beschriebenen Methode bestimmt.
Die verwendeten Peptide und die intramolekularen Abstände zwischen den am Peptid gebundenen Donoren und Akzeptoren sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5:

Peptid	End zu End Abstand (r) Å
a) BOC-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEG	15.794
b) BOC-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEG	15.4
c) BOC-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEG	16.53

Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen gute Übereinstimmung mit Werten, die nach der Energieübertragungsmethode für Peptide mit der gleichen Anzahl Aminosäuren berechnet oder gemessen wurden.

So hat z.B. Englert 1978 (105) den Donor-Akzeptor-Abstand in Tyr-$(Ala)_4$-Trp als 14.5 Å berechnet, Haas (92) bestimmte 1975 den Abstand für D-$(Glu)_4$-N als 15.2 Å. Hier ist Glutamin mit Dansyl und Naphthalin gebunden.

Die Analyse der Ergebnisse aus Tabelle 5 zeigt:

1) Die zwei Peptide a und b, die aus den gleichen Aminosäuren bestehen und sich nur in Anordnung in Position 3 und 4 unterscheiden, zeigen intramolekulare Abstände, die um ca. 0.4 Å differieren. Dies mag die früher beobachtete Änderung in ihrem CD-Spektrum in Wasser (Abb. 5) erklären.
2) Vergleicht man die Peptide (a) und (c), wo Gly durch Aib ersetzt wurde, so wird von (a) nach (c) eine Zunahme der gemessenen Abstände von ca. 0.7 Å beobachtet.

Die End- zu End-Distanzen aller drei Peptide stimmen somit mit den Werten von theoretisch berechneten Hexapeptiden unter der Annahme einer random-coil Konformation überein. Die im CD-Spektrum angedeuteten Anteile an ß-Struktur scheinen durch die große Verdünnung in Lösung zerstört worden zu sein. Die Zunahme des End- zu End-Abstandes im Falle von Peptid C ist auf den Ersatz eines Gly durch Aib zurückzuführen und beweist die wesentlich geringere Flexibilität von Aib gegenüber Gly.

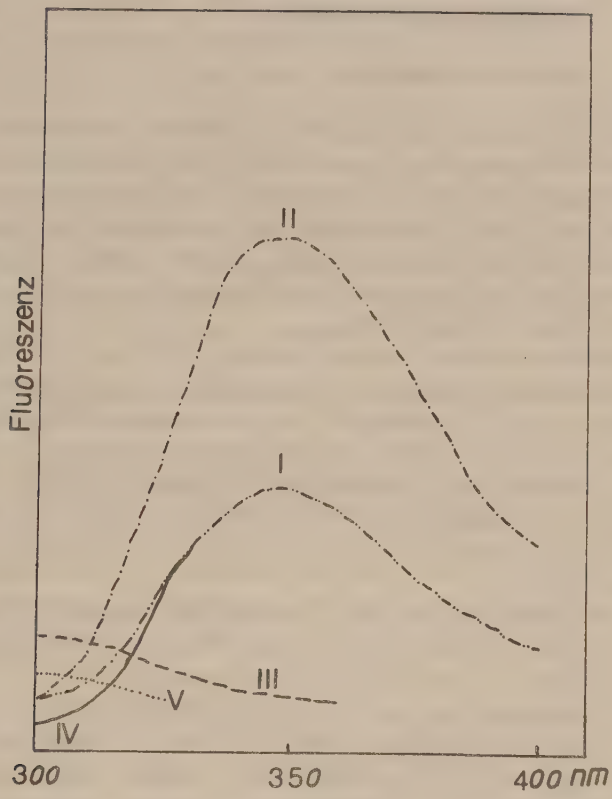


Abbildung 7:

I Fluoreszenz der Peptide mit Tyr und Trp als Endgruppen und Anregung bei 270 nm

II Anregung bei 293 nm

III Fluoreszenz der Peptide die nur Tyr enthalten, Anregung bei 270 nm

IV Ergebnis der Normalisierung von I und II bei 360 nm

V Fluoreszenz, die vom Donor beim Akzeptor induziert wurde.

5. Synthese von Homo-Oligo-Peptiden zur Konformationsuntersuchung

5.1. Oligo-L-Isoleucin

Oligo-L-Isoleucin bildet infolge starker hydrophober Wechselwirkungen der Seitenketten, die stabilsten intermolekularen Strukturen (ß-Struktur) aus und neigt auch schon bei kurzen Kettenlängen zu Aggregation in fast allen Lösungsmitteln (106, 107). Es war deshalb zu erwarten, daß die Synthese des Oktapeptids zu großen Löslichkeitsproblemen führt.
Um möglichst starke Solubilisierung durch die C-terminale Schutzgruppe zu erreichen, wurde deshalb PEG MG 5000 benutzt. Für die Anwendung fluoreszenzspektroskopischer Methoden zur Bestimmung intramolekularer Abstände ist das Vorhandensein von 2 chromophoren Gruppen notwendig, wobei das Emissionsspektrum der einen Gruppe (Donor) mit dem Absorptionsspektrum der anderen Gruppe (Akzeptor) überlappen muß.
Deshalb enthalten die hier untersuchten Sequenzen einen Tyrosinrest in Position 1 als Donor und einen Tryptophanrest in der letzten Position als Akzeptor.
Die Veresterung des PEG mit Boc-Tyrosin verlief in guten Ausbeuten. Die Synthese wurde mit einer Beladung von 79.4 % Th. begonnen. Die Kupplung erfolgt zunächst mit 5-fachem Überschuß an Boc-Ile-Anhydrid das nach der DCC-Methode separat dargestellt wurde (108). Die Umsatzkontrolle erfolgte durch quantitative Ninhydrinreaktion (122). Die überschüssigen Komponenten wurden bei quantitativem Umsatz nach der Kristallisationsmethode durch Zugabe von Diäthyläther zur Kupplungslösung entfernt. Die Abspaltung der N-terminalen Boc-Schutzgruppe erfolgte durch Behandeln mit TFA/CH_2Cl_2 (1:1).

Während der Synthese nahm die Viskosität des PEG-Peptids in CH_2Cl_2 mit wachsender Kettenlänge kontinuierlich zu. Aus diesem Grund wurden ab Synthesestufe 4 steigende Mengen von DMF und DMSO zur Kupplungslösung zugesetzt. Ab Stufe 5 wurde in einer Mischung von DMF/DMSO gekuppelt, da die Löslichkeit in CH_2Cl_2 nicht mehr ausreichte, um eine homogene, rührbare Lösung zu erhalten. Bei der Fällung des PEG-Peptids mit Äther wurde ab Stufe 4 zunächst ein hochviskoses Öl erhalten. Die Kristallisation des Produktes erfolgte aus verdünnter Lösung (ca. 1-5 % in DMF/DMSO) durch Zugabe von Äther. Nach Rühren in Eisbad wurden gut filtrierbare Produkte erhalten.

5.1.1. Konformationsuntersuchungen von Homooligo-Ile mit CD

Wegen der hydrophoben Seitengruppen und des ausgeprägten Energieminimums für eine ausgestreckte Konformation wurden für Oligo-(L-Ile) besonders stabile ß-Strukturen erwartet. Erste Untersuchungen von Toniolo et al. (110) schienen dies zu bestätigen. Eine genaue Konformationsanalyse dieses präparativ schwer zugänglichen Peptids, insbesondere Stabilitätsuntersuchungen der Sekundärstruktur, waren deshalb von großem Interesse.
In Abbildung 9 sind die CD-Spektren von Boc-Trp-$(L\text{-Ile})_n$-Tyr-PEGM (Mol.-Gew. 5000) für n = 3,4,5,6 in TFE dargestellt.
Die Oligomeren bis zu Kettenlängen von n = 3 besitzen ungeordnete und random coil-Struktur. Ab n = 4 zeichnet sich die Ausbildung ß-artiger Strukturen ab, es liegt aber noch vorwiegend Random Coil vor. Boc-Trp-$(L\text{-Ile})_6$-Tyr-PEGM liegt dagegen in einer reinen ß-Struktur vor, (negativer Cotton-effekt bei 217 nm, Nulldurchgang bei 200 nm).
Auch das Hexapeptid besitzt eindeutig ß-Struktur. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit denen von Toniolo et al. überein (110).

a) Temperaturabhängigkeit der Konformation

Um eventuelle Stabilitätsunterschiede in der Konformation der verschiedenen Derivate festzustellen, wurde im Bereich von etwa 4°, 27° und 58° C die Temperaturabhängigkeit der Sekundärstruktur untersucht.
Abbildung 8, 9 und 10 zeigt die CD-Kurven von Boc-Trp-$(L\text{-Ile})_n$-Tyr-PEGM n = 3,4,5,6 bei 4°, 27° und 58° C.
Die Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf. Bei allen vier Verbindungen überwiegt bei RT die ß-Struktur.
Diese Ordnung wird durch Temperaturerhöhung zunehmend gestört. Bei 58° C deutet der Kurvenverlauf auf größtenteils ungeordnete Struktur hin. Vergleichbar sind außerdem die Spektren des Penta- und Hexapeptids. Hier ist die ß-Struktur so stabil, daß sie im angegebenen Temperaturbereich kaum eine Änderung erfährt.

b) Konformationsuntersuchungen von Homooligo-Ile in Wasser

Die Stabilität der ß-Struktur in Wasser bei der Konzentration 5×10^{-5} M/l wurde durch die Aufnahme eines CD-Spektrums des Hexapeptids unter diesen Bedingungen untersucht.
Das CD-Spektrum des Hexapeptids zeigt deutlich, daß das Peptid auch in Wasser trotz hoher Verdünnung noch vorwiegend in ß-Struktur vorliegt (Abb. 11).
Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Distanzmessungen überein.

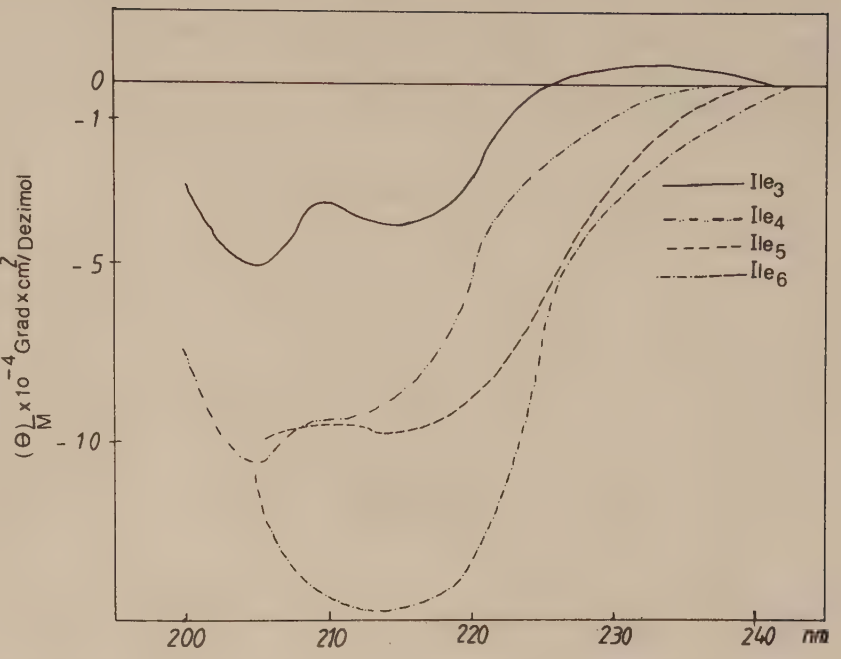


Abbildung 8: CD-Spektren von Boc-Trp-$(Ile)_n$-Tyr-PEG n = 3,4,5,6 in TFE c = 1 mg Peptid/ml bei 4° C

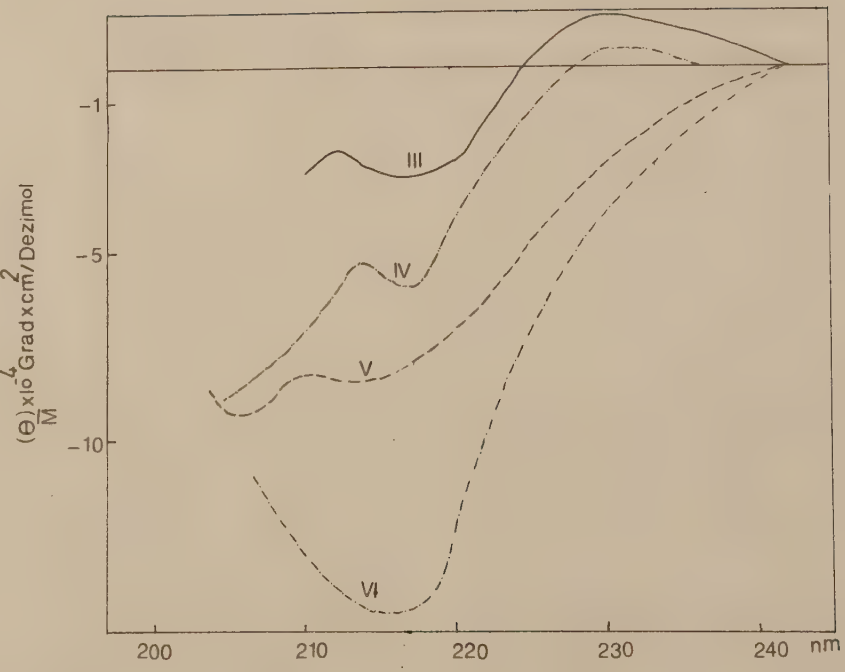


Abbildung 9: CD-Spektren von Boc-Trp-$(Ile)_n$-Tyr-PEG n = 3,4,5,6 in TFE c = 1 mg Peptid/ml bei 27° C

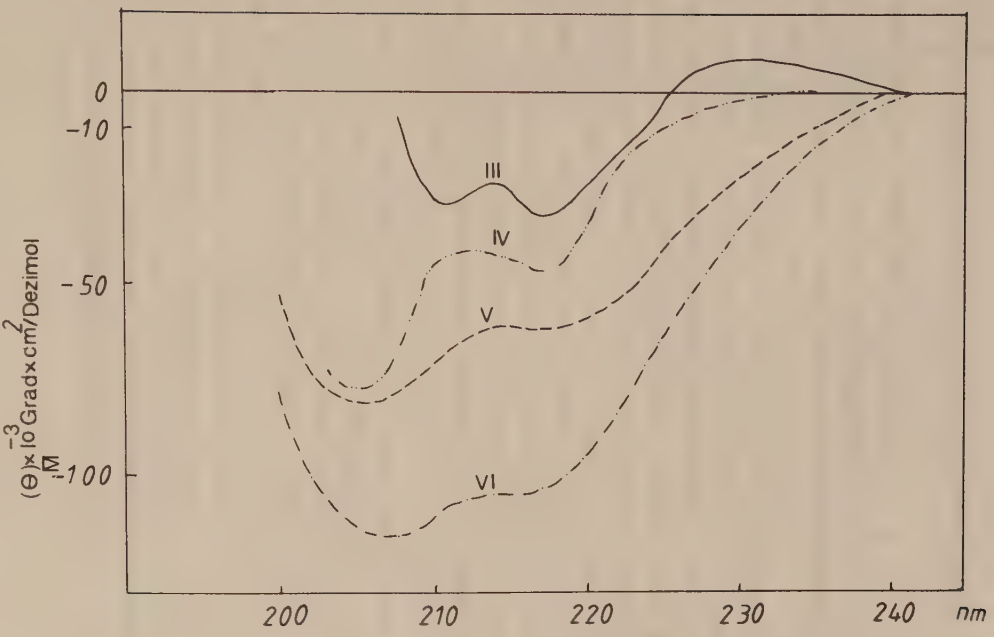


Abbildung 10: CD-Spektren von Boc-Trp-$(Ile)_n$-Tyr-PEG n = 3,4,5,6 in TFE
c = 1 mg Peptid/ml TFE bei 58° C

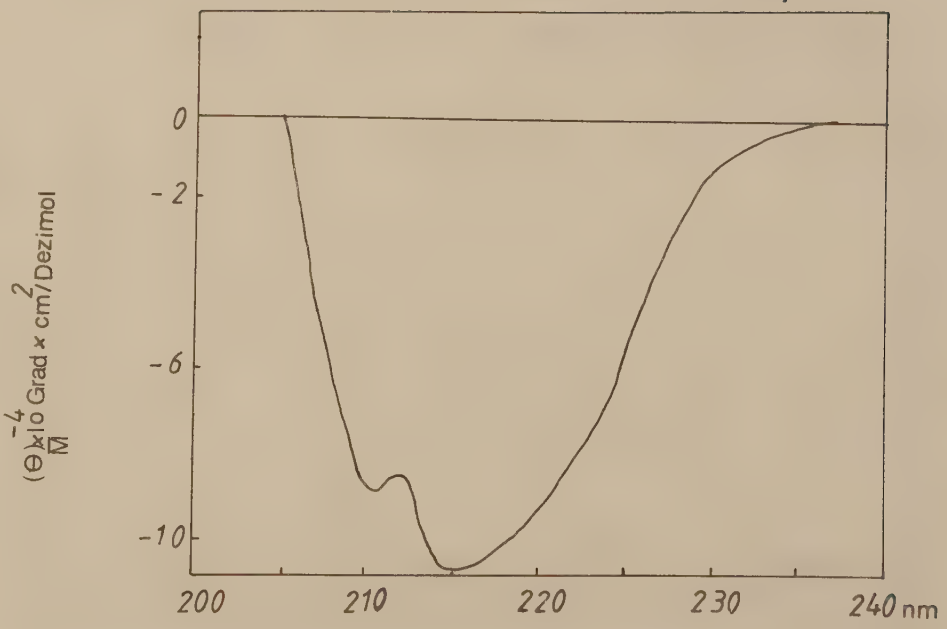


Abbildung 11: CD-Spektrum von Boc-Trp -$(Ile)_6$-Tyr-PEG in Wasser c = 5 x 10^{-5} Mol/l

5.1.2. Konformationsuntersuchungen von Homooligo-Ile durch IR

Einführung und Aufnahme der Spektren siehe Kapitel 3.3.2.

Ergebnisse und qualitative Diskussion

In Abbildung 12 sind die Absorptionsspektren der folgenden Peptide in den jeweiligen Bereichen zusammengestellt.
Boc-Trp -$(Ile)_n$-Tyr-PEGM n = 3,4,5,6.
Aus Tabelle 6 geht hervor, daß beim schrittweisen Aufbau des Peptides die Amid-I-Bande bei 1636 cm^{-1} unverändert stark bleibt. Eine zusätzlich auftretende schwache Bande (Schulter) bei 1700-1715 cm^{-1} könnte entweder durch die C-O Streckschwingung der Urethanbindung der Boc-Gruppe hervorgerufen werden, oder auf eine antiparallele ß-Struktur hinweisen. Allerdings nimmt die Intensität dieser Schulter mit zunehmender Kettenlänge ab. Durch die Absorption bei 700 cm^{-1} (Amid V) kann nicht eindeutig auf das Vorliegen einer ß-Struktur geschlossen werden, da in diesem Bereich auch die Aromatenschwingung des Tyrosins zu erwarten sind.

Aus dem vorliegenden Spektrum kann somit geschlossen werden, daß PEG-geschützte Penta- und Hexapeptide auch im Festzustand in einer ß-Struktur vorliegen, wobei die Assoziation durch eine antiparallele Anordnung der Ketten zustande kommt (111).
Die Ergebnisse der IR-Untersuchungen unterstreichen somit die durch CD-Messungen erhaltenen Befunde.
Beim stufenweisen Aufbau von Boc-Trp-$(Ile)_n$-Tyr-PEGM n = 2,3, 4,5,6 scheint ein Übergang von ungeordneter (randem coil) zur ß-Struktur sowohl im Festzustand wie auch in Lösung stattzufinden.

Tabelle 6: Die Absorptionsspektren von Boc Trp $(Ile)_n$ Tyr PEG
n = 2,3,4,5,6

Peptid	Amid A 3200-3450	Amid I 1720-1600	Amid II 1600-1500	Amid V 750-600
Boc Trp$(Ile)_2$ Tyr PEG	3290/3330	1640	1555/1517	748/705
Boc Trp$(Ile)_3$ Tyr PEG	3285	1635	1555/1517	748/707
Boc Trp$(Ile)_4$ Tyr PEG	3280	1635	1557/1520	750/725/705
Boc Trp$(Ile)_5$ Tyr PEG	3280	1635	1560/1520	752/737/710
Boc Trp$(Ile)_6$ Tyr PEG	3275	1633	1557/1520	750/725/707

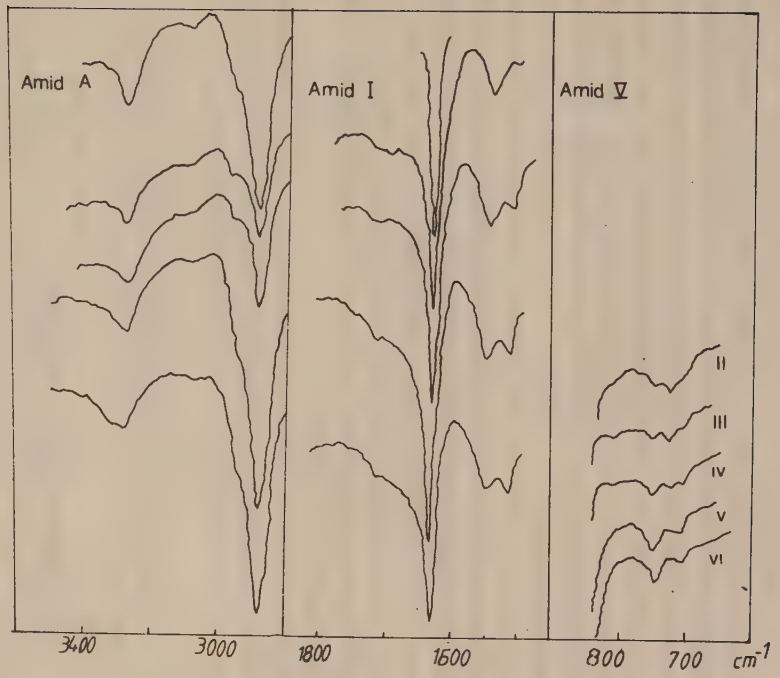


Abbildung 12: IR Absorptionsbanden von Boc-Trp-$(Ile)_n$-Tyr-PEG
n = 2,3,4,5,6 im Amid-A, Amid-I und Amid-V Bereich

5.1.3. Konformationsuntersuchungen von Homooligoisoleucin, an das Tyr und Trp gebunden ist, nach der Energie-Transfer-Methode

Einleitung

Untersuchungen von gut charakterisierten, monodispersen, linearen Homooligopeptiden sind für die Interpretation bevorzugter Konformationen bei biologisch aktiven Peptiden sehr nützlich gewesen. Insbesondere kann aus der Konformationsanalyse homologer Serien die zur Bildung stabiler Sekundärstrukturen erforderliche Mindestanzahl an AS-Resten bestimmt werden.
Im bisherigen Teil dieser Arbeit wurde eine Konformationsanalyse mit Hilfe des Circulardichroismus an einer Serie von L-Isoleucin-Oligomeren durchgeführt, die die allgemeine Formel BOC-Trp-$(Ile)_n$-Tyr-PEG(n = 1-6) hatten. Die Messungen wurden in TFE und Wasser vorgenommen.
Die Ergebnisse zeigen, daß diese Oligomere ab dem Hexameren ß-Konformationen bilden.
Um die bisherige Konformationsanalyse, die mit CD gemacht wurde, zu bestätigen, wurde eine weitere Untersuchung mit der Energie-Transfer-Methode durchgeführt.

Theoretische und Experimentelle Untersuchung

Analog Seite

Ergebnisse und Diskussion

In der folgenden Untersuchung wurden nach der LPM zwei Serien von Oligo-Ile dargestellt. Die eine hatte Tyr und Trp folgendermaßen gebunden:
BOC-L-Trp-L-$(Ile)_n$-L-Tyr-PEG die andere hatte nur Tyr gebunden: BOC-L-$(Ile)_n$-L-Tyr-PEG (n = 1-6).

Die gemessenen Werte der intramolekularen Abstände zwischen dem Donor Tyr und dem Akzeptor Trp sind für alle Kettenlängen in Tabelle 7 angegeben.

Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen gute Übereinstimmung mit den nach der Energie-Transfer-Methode gemessenen oder berechneten Werten.
Englert (105) berechnete 1978 den "End zu End" Abstand für Tyr-$(Ala)_4$-Trp zu 14.5 Å. Edelhoch (112) maß 1968 den Abstand für Tyr-Gly-Tyr und Tyr-Gly_2-Tyr mit 11 bzw. 13.1 Å. Haas (92) bestimmte 1975 die Abstände für Glutamin mit Naphthalin und Dansyl als Endgruppen:

D - Glu_4 - N 15.2 Å

D - Glu_5 - N 15.8 Å

und D - Glu_6 - N 16.4 Å .

Tabelle 7: Durch Fluoreszensmessungen bestimmte Abstände zwischen carboxylendständigem Tyrosin und aminoendständigem Tryptophan in Å

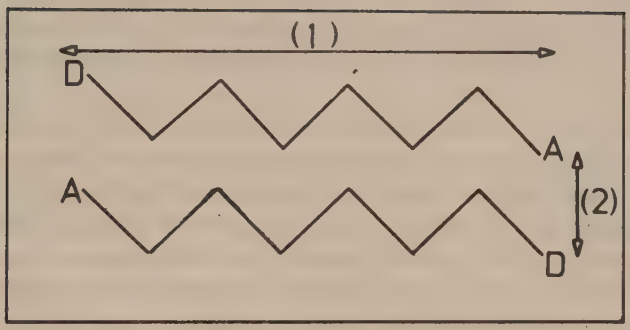
Nr.	Peptid	(r) Å, End zu End Abstand H_2O	H_2O + 1% H_2SO_4
1	BOC-Trp-(Ile)-Tyr-PEG	11.48	-
2	BOC-Trp-$(Ile)_2$-Tyr-PEG	13.66	-
3	BOC-Trp-$(Ile)_3$-Tyr-PEG	14.05	-
4	BOC-Trp-$(Ile)_4$-Tyr-PEG	14.55	-
5	BOC-Trp-$(Ile)_5$-Tyr-PEG	15.46	16.305
6	BOC-Trp-$(Ile)_6$-Tyr-PEG	15.91	16.93

Die Ergebnisse aus Tabelle 7 zeigen, daß Peptid (1) hauptsächlich in ungeordneter Form vorliegt. Seine intramolekulare Länge ist um ca. 2 Å kürzer als die von Peptid (2), während die Peptide (2) - (4) einen gleichmäßigen Anstieg ihrer Länge von je 0.5 Å von (2) nach (4) aufweisen.

Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Peptide (2) - (4) eine Konformation aufweisen, die eine Mischung aus ungeordneter und ß-Struktur darstellt. Der Konformationswechsel von der ungeordneten Form zur ß-Struktur verläuft linear. Der beobachtete Anstieg bei Peptid (5) um ca. 1 Å im Vergleich zu (4) zeigt, daß (5) allmählich eine andere Struktur als (4) annimmt. Dies kann dadurch erklärt werden, daß Peptid (5) teilweise ß-Konformation besitzt. Möglicherweise entspricht die Zunahme des End-zu-End-Abstandes beim Vorliegen einer antiparallelen ß-Struktur nicht dem theoretischen Wert, da durch Aneinanderlagerung von Peptidketten auch in intermolekularer Energietransfer möglich ist (Schema 1).
Der End-zu-End-Abstand des Peptids (6) ist um ca. 0.5 Å größer als der des Peptids (5).

In der zweiten Spalte von Tabelle 6 ist der End-zu-End-Abstand von Penta- und Hexa-Ile wiedergegeben; er wurde wieder in wässriger Lösung nach Zugabe von 1% konz. Schwefelsäure gemessen. Der Anstieg der intramolekularen Abstände kann auf die bessere Löslichkeit nach der Zugabe der Säure zurückgeführt werden, was auch die Peptidassoziation senken kann.

Allgemein läßt sich feststellen, daß die Ergebnisse nach der Energietransfer-Methode in qualitativer Übereinstimmung mit denen aus den CD-Spektren stehen.
(vgl. Abbildung 8, 9, 10).



Schema 1: D = Donor Molekül
A = Akzeptor Molekül
(1) = Intramolekular Energietransfer
(2) = Intr molekular Energietransfer

5.2. Synthese von Oligo-L-Methionen

Als C-terminale Schutzgruppe wurde PEG, Mol.-Gew. 5000 gewählt. Zunächst wurde PEG mit Boc-Tyrosin (Boc-Tyr) quantitativ verestert. Wie im Fall der Oligo-L-Ile-Synthese nahm die Viskosität des PEG-Peptids in CH_2Cl_2 mit wachsender Kettenlänge zu. Besonders drastisch war der Viskositätsanstieg zwischen den Stufen 5-8. Aus diesem Grund wurden ab Stufe 5 steigende Mengen DMF bzw. DMSO zur Kupplungslösung zugesetzt. Ab Stufe 7 wurde in einer Mischung von DMF/DMSO gekuppelt, da die Löslichkeit in CH_2Cl_2 nicht mehr ausreichte, um eine homogen rührbare Lösung zu erhalten. Ab dieser Stufe wurden auch die Kupplungsreaktionen über Nacht durchgeführt, wobei der Fluramtest in allen Stufen quantitative Reaktion anzeigte.

Ab Stufe 9 nahm die Löslichkeit des PEG-Peptids stark zu, so daß eine Mischung von DMF/CH_2Cl_2 ausreichte um eine homogene Lösung zu erhalten. Vermutlich fand beim Peptid an dieser Stelle ein Konformationswechsel (ß-Struktur ⟶ α-Helix) statt.
In einzelnen Synthesestufen wurden die überschüssigen Reagenzien durch Umfällen des PEG-Peptids entfernt.
In allen Fällen reichte 2-3-maliges Ausfällen aus CH_2Cl_2/DMF durch Zugabe von Äther, um ein dünnschichtchromatographisch einheitliches Produkt zu erhalten.
Die Abspaltung der N-terminalen Boc-Schutzgruppe erfolgte durch Behandlung mit TFA/CH_2Cl_2 (1:1).

Von Stufe 7 bis Stufe 9 wurde die Abspaltung in reiner TFA durchgeführt. Die Mischung von TFA/CH_2Cl_2 wurde ab Stufe 10 bis Ende der Synthese verwendet.
Die Synthese wurde bis zur Stufe des 16-Peptids durchgeführt. An der letzten Position wurde Boc-Trp gekuppelt. Die Kupplung des PEG-Peptids mit Boc-Trp wurde in guten Ausbeuten erreicht.
Die folgenden Sequenzen werden zur Konformationsuntersuchung verwendet:

1-Boc-Trp-$(Met)_7$-Tyr-PEG 2-Boc-Trp-$(Met)_{10}$-Tyr-PEG
3-Boc-Trp-$(Met)_{12}$-Tyr-PEG 4-Boc-Trp-$(Met)_{14}$-Tyr-PEG

5.2.1. Konformationsuntersuchungen von Homooligo-L-Methionin durch CD

Abbildung 13 zeigt die CD-Spektren der folgenden Peptide:

Boc-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEG n = 7,10,12,14

in TFE. Die charakteristischen CD-Daten deuten bei allen Kurven auf das überwiegende Vorliegen von α-Helix-Strukturen hin. Alle vier Kurven zeichnen sich durch zwei negative Cottoneffekte aus. Dabei erfahren der längerwellige Cottoneffekt ($n - \pi^*$) bei ca. 222 nm und der kurzwellige negative Cottoneffekt ($\pi - \pi^*$) bei ca. 207 nm eine deut-

liche Intensitätszunahme von I bis IV. Diese Daten deuten auf eine helikale Struktur hin. Bei Übergang vom Helix-fördernden Lösungsmittel TFE zu Wasser tritt eine Verschiebung der beiden negativen Cottoneffekte auf. Die charakteristischen CD-Daten von Met_7, Met_{12} und Met_{14} deuten auf das Vorliegen einer Mischung aus random-coil Konformation und α-Helixstruktur hin. Dabei ist aus der Verschiebung und Zunahme des $n \rightarrow \pi^*$ Übergangs eine kontinuierliche Zunahme an Sekundärstruktur abzuleiten. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Toniolo et al., an Homooligomethioninsequenzen (113). Dort wurde beim Wechsel von TFE zu H_2O ein Konformationswechsel von α-Helix zu ß-Struktur für das Heptapeptid beobachtet. Der Unterschied in der Konformation kann somit nur durch Anwesenheit des N-terminalen Trp erklärt werden. Offensichtlich verhindert das sterisch ungünstige Trp die Ausbildung einer antiparallelen ß-Struktur. Ein qualitativer Hinweis für diese Interpretation bildet die Tatsache, daß die N-Trp-geschützten Homooligomethioninderivate eine wesentlich bessere Löslichkeit in H_2O zeigen gegenüber den reinen Homooligopeptiden.

5.2.2. Konformationsuntersuchungen durch IR

Die IR-Spektren von Boc-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEGM n = 7,10,12,14 zeigen, daß beim schrittweisen Aufbau des Peptides die Amid I Bande bei 1655 cm^{-1} (charakteristische Bande für ß-Struktur) ab n = 7 unverändert stark bleibt.
Eine zusätzlich auftretende schwache Bande (Schulter) bei 1710-1715 cm^{-1} kann durch die Urethanbindung der Boc-Schutzgruppe auftreten. Die Bande bei 600-700 cm^{-1} ist geringfügig in Methioninpeptiden, da in diesem Bereich auch die C-S Streckschwingung zu erwarten ist.
Aus den vorliegenden Spektren kann somit geschlossen werden, daß PEG-geschützte Methioninpeptide ab n = 7 im Festzustand vorwiegend in der ß-Struktur vorliegen.

Die Ausbildung einer α-Helix konnte hier nicht beobachtet werden (114).

Tabelle 8: IR Daten von Boc-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEGM
n = 7,10,12,14 im Festzustand

N	Amide A		Amide I		Amide II	
7	3360	3190 sh	1655	1710 sh	1510	1528 sh
10	3355	3190 sh	1655	1715 sh	1510	1528 sh
12	3350	3190 sh	1655	1712 sh	1510	1528 sh
14	3350	3190 sh	1656	1715 sh	1510	1528 sh

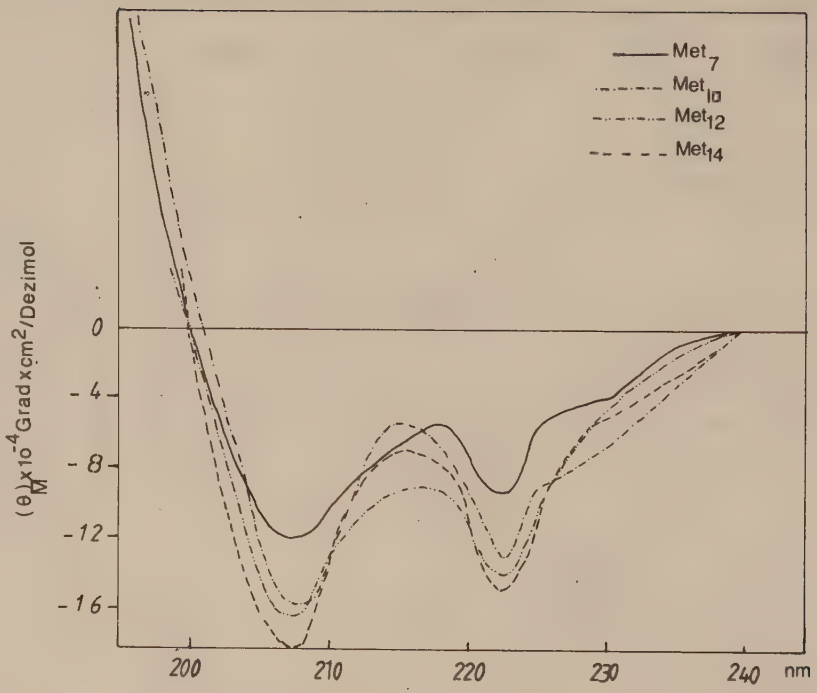


Abbildung 13: CD-Spektren von Boc-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEG n = 7,9,12,14 in TFE
c = 1mg Peptid/ml

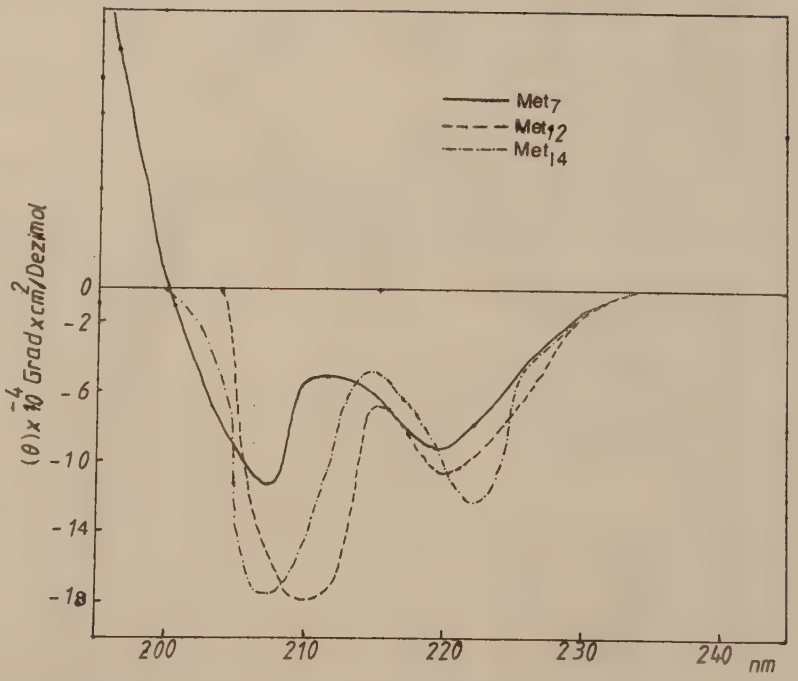


Abbildung 14: CD-Spektren von Boc-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEG n = 7,12,14 in Wasser
c = 2m Peptid/ml

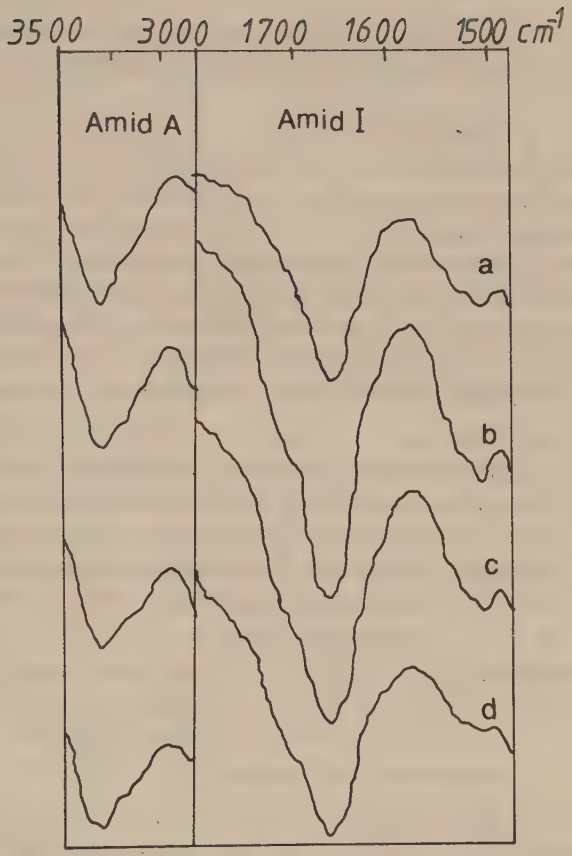


Abbildung 15: IR-Absorptionsbanden von Boc-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEG im Amid-A-, AmidI-Bereich.
n = 7(a), 10(b), 12(c), 14(d)

5.2.3. Konformationsuntersuchungen an Homooligo-L-Methionin mit Hilfe der Energie-Transfer-Methode

Einleitung

Die in Abschnitt 5.1.3. vorgestellten Untersuchungen an PEG gebundenen Peptiden mit Hilfe der Energie-Transfer-Methode haben gezeigt, daß die für $(Ile)_n$ von n = 2 bis n = 6 angenommene ungeordnete Struktur bei steigender Kettenlänge (n = 5,6) in die ß-Struktur übergeht.
Die vorliegende Konformationsanalyse zielt darauf, die α-Helix in Lösung nachzuweisen.
Die Methionin-Reihe wurde aus folgenden Gründen gewählt:

1) Man nimmt an, daß Methionin in Proteinen eher eine α-Helix bildet, als eine ß-Struktur (115).
2) Poly(L-Met) von hoher Kettenlänge nimmt im Festzustand eine α-helixartige Konformation ein. Es wurde vorgeschlagen (116), daß der Übergang zu einer α-helixartigen Struktur im Festzustand schon im Bereich von n = 10-13 erfolgen könnte.

Ausgehend von obigen Überlegungen wurde Homooligo-L-Met mit n = 7,10,12,14 nach der LPM dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abschnitt 4.4. (c) wurden 2 Reihen von Oligo-L-Met dargestellt, und zwar BOC-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEG für n = 7,10, 12,14 zbw. BOC-$(Met)_n$-Tyr-PEG mit n = 7,10,12,14.

Die gemessenen Werte der intramolekularen Abstände zwischen dem Donor Tyr und dem Akzeptor Trp für die obengenannten Sequenze der Methionin-Reihe sind in Tabelle (19) wiedergegeben.
Die Ergebnisse der Tabelle (19) stehen in guter Übereinstimmung mit den von Haas nach der Energie-Transfer-Methode gemessenen Werten (92).

In seiner Arbeit bestimmte er den End-zu-End-Abstand von Glutamin-gebundenen Naphthalin- und Dansylresten als

$D\ G_7N = 19.4\ \text{Å}$

$D\ G_8N = 20.6\ \text{Å}$

$D\ G_9N = 21.6\ \text{Å}$

Die in Tabelle 9 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen einen Anstieg der Kettenlänge um 0.8 und 0.9 Å als Ergebnis der Einführung eines Met-Restes von n = 7-10 bzw. n = 10 bis 12. Wurde die Zahl der Met-Reste von n = 12 auf n = 14 erhöht, war ein Anstieg auf 1.5 Å pro Met-Rest festzustellen.

Diese Ergebnisse können ebenso wie die CD-Messungen der kontinuierlichen Bildung einer α-Helix von n = 7 bis n = 14 zugeschrieben werden.
Der relativ große Anstieg in den gemessenen End-zu-End-Abständen von $(Met)_{14}$ zeigt die große Tendenz zur Bildung einer α-helixartigen Konformation.

Tabelle 9: Durch Fluoreszenzmessungen bestimmte Abstände zwischen Carboxylendständigem Tyrosin und aminoendständigem Trpytophan in Å

Nr.	Peptid	End-zu-End-Abstand (r) Å
1	BOC-Trp-$(Met)_7$-Tyr-PEG	20.49
2	BOC-Trp-$(Met)_{10}$-Tyr-PEG	22.85
3	BOC-Trp-$(Met)_{12}$-Tyr-PEG	24.76
4	BOC-Trp-$(Met)_{14}$-Tyr-PEG	27.81

III. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Verwendete Geräte

Autotitrator	Radiometer Copenhagen, TYP TTT 1C mit autom. registrierendem Schreiber, TYP SBR 2C.
IR	Perkin-Elmer Infracord.
Aminosäureanalysator	Beckmann Unichrom.
PH-Meter	Firma Metrohm, Herisau.
Schmelzpunktbest.	Apparat nach Tottoli, TYP SMP 20, Fa. Büchi
Fraktionssammler	LKB 7000 u. Uvicord, LKB Produkter, AB Stockholm
Lyophilisator	Cont. Freeze Dryer New Brunswick
Zentrifuge	Sovrall RC-2
UV-Lampe	UVIS, Firmengruppe DESAGA, Universalgerät für 254/366 nm und Tageslicht-Visualisation
CD	Dichrograph Modell CD 185, Jouan Roussel
Fluoreszenzemmissions-Spektrometer	Zeiss Fluoreszenz Spektrometer modifiziert mit (RCA Nr. 7850) PM

2. Chemikalien und Lösungsmittel

Während der Synthesen wurden nur absolute Lösungsmittel verwandt. Methylenchlorid wird über K_2CO_3 destilliert und über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt.
DMF wird durch azeotrope Destillation (1l DMF, 120 ml Benzol und 50 ml Wasser) vorgetrocknet und anschließend über CaH_2 destilliert.
Diäthyläther wird über $CaCl_2$ vorgetrocknet und über Na-Dispersion destilliert.

Essigsäure wird über P_4O_{10} vorgetrocknet und anschließend destilliert. DCCI wird im Hochvakuum destilliert und als 2m Lösung in Methylenchlorid eingesetzt.
Das PEG stammt von den Firmen Roth, Chemische Werke Hüls und Hoechst. Es wird vor Gebrauch zweimal mit Äther aus CH_2Cl_2 umgefällt und am Hochvakuum getrocknet.
Die Aminosäuren lieferte Fa. Merck.
Sephadex G25 medium und LH 20 stammte von der Fa. Pharmacia.
DC-Platten Kieselgel 60 mit und ohne Fluoreszenzindikator wurden ebenfalls von der Fa. Merck bezogen.
Boc-Azid wurde nach L. Carpino (117) synthetisiert.
HOBt (118,119,120) wird aus o-Nitrochlorbenzol und Hydrazinhydrat hergestellt.

3. Allgemeine Arbeitsverfahren

3.1. Aminosäureanalyse.

Ca. 1 µmol Peptid werden genau in ein Hydrolyseröhrchen eingewogen und mit 3-4 ml 6n HCl versetzt. Bei schwer löslichen Polymerpeptiden wird noch 20% TFA zugegeben. Ein geringer Zusatz von Phenol erbringt bei tyrosinhaltigen Peptiden bessere Ergebnisse.
Die Lösung wird in flüssigem N_2 eingefroren und das Röhrchen am Hochvakuum zugeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgt während 24 h bei 110° C.
Die Lösung wird anschließend im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.
Der Rückstand wird nach Spackmann und Moore (121) analysiert.

3.2. Dünnschichtchromatographie

Folgende Systeme wurden eingesetzt:

A Butanol : Eisessig : Wasser = 3:1:1
B Chloroform : Methanol = 7:3
C Chloroform : Methanol : Eisessig : Wasser = 60:45:6:14

Ninhydrinlösung (122,123)

300 mg Ninhydrin werden in 100 ml n-Butanol und 3 ml Eisessig gelöst. Diese Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt. Das Chromatogramm wird mit dieser Lösung besprüht. Bei 110° C ergeben freie und geschützte Aminosäuren nach 5-20 Minuten eine rotviolette Färbung.

Chlor-Tolidin-Test (124,125)

80 mg o-Tolidin, 15 ml Essigsäure und 0,5 g KJ werden mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt.
Das getrocknete Chromatogramm wird mit Wasserdampf befeuchtet und dann in einer Chlorkammer 15 Minuten chloriert, danach zur Entfernung des überschüssigen Chlors ausreichend belüftet und mit dem Reagenz besprüht.

Dragendorff-Bürger-Reagenz (126)

a) 1,7 g basisches Wismutnitrat werden in 20 ml Eisessig gelöst. Nach Zusatz von 80 ml Wasser, einer Lösung von 40 g KJ in 100 ml Wasser und 200 ml Eisessig wird mit Wasser auf 1000 ml verdünnt.
b) Bariumchloridlösung (20% in Wasser)
Vor Gebrauch werden 2 Vol. a) mit 1 Vol. b) gemischt. Polyäthylenglykol ergibt mit dem Reagenz nach Besprühen eine intensive Gelbfärbung.

3.3. Synthese der Boc-Aminosäuren (127)

0.1 Mol einer Aminosäure werden in 25-100 ml Dioxan/Wasser (1:1) gelöst. Der vorgewählte pH-Wert (zwischen pH 9-11) wird mit 4N NaOH mit dem pH-Stat automatisch eingeregelt. Unter kräftigem Rühren werden 15 ml (0.11 Mol) tert.-Butyloxycarbonylazid, das nach Carpino (1) dargestellt wird, zugesetzt. Nach Beendigung des Alkaliverbrauchs (etwa 6-12 h) wird die Lösung mit Äther ausgeschüttelt und der Ätherextrakt verworfen. Die wässrige Lösung wird

mit gleichem Volumen Essigester überschichtet und unter starkem Rühren und pH-Kontrolle mit verdünnter HCl (oder Citronensäure) auf pH 3 gebracht. Die angesäuerte Lösung wird insgesamt 3 mal mit Essigester ausgeschüttelt, die Extrakte vereinigt und so oft mit jeweils 20 ml NaCl-gesättigtem H_2O gewaschen (ca. 5 mal) bis der Ninhydrintest in Lösung negativ ausfällt. Anschließend wird über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die BOC-Aminosäuren lassen sich im allgemeinen aus wenig Essigester unter Petrolätherzusatz kristallisieren. Die Ausbeuten liegen zwischen 60 und 90 % (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen zur Darstellung der BOC-Aminosäuren

BOC-As	pH	Reaktions-zeit (h)	Ausbeute %	Fp. °C	Lit. °C
BOC-Gly	10	8	80	89-91	94-95
BOC-Val	9.8	8	66	72-73	72-73
BOC-Pro	9.1	10	75	133-134	136-137
BOC-Trp	10.4	10	68	132-134	135-137
BOC-Tyr(OBzl)	10.3	14	76	109	108-110
BOC-Ile	9.8	6.5	96	68	57
BOC-Met	9.8	6	88	133-135	138-139

4. Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz Boc-Val-Pro-Gly-Gly-H

4.1. Durch direkte Veresterung von PEG

4.1.1. Veresterung von PEG mit BOC-Gly

10 g über P_4O_{10} getrocknetes PEG, Mol.-Gew. 3000 werden in 100 ml CH_2Cl_2 gelöst, und BOC-Gly-Anhydrid (separat mit DCC hergestellt ([108])) in 5-fachem Überschuß zugegeben. Die Lösung wird mit 4 ml Pyridin als Katalysator versetzt, auf ca. 50 ml eingeengt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird der PEG-Ester mit Äther gefällt und aus CH_2Cl_2 noch zweimal umgefällt. Der gereinigte PEG-ester wird bei 10^{-1} Torr getrocknet.
Ausbeute: 9.39 g = 93 %
Beladung: 83.8 %

4.1.2. Stufenweise Synthese des Peptides

Ausgehend von PEG_{3000}-Gly-BOC geschieht der stufenweise Aufbau der weiteren Aminosäurederivate wie folgt:
Zur Abspaltung der Schutzgruppe werden 3 g BOC-Gly-PEG_{3000} mit 20 ml einer Mischung aus CH_2Cl_2/TFA (1:1) während 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt, anschließend die Lösung i.Vak. eingeengt (auf ca. 5 ml) und das Produkt durch Zutropfen von kaltem Äther ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mehrmals mit Äther gewaschen, erneut in wenig CH_2Cl_2 aufgenommen, wieder mit Äther ausgefällt und der Rückstand i.Vak. getrocknet.
Ausbeute: 3 g H-Gly-PEG_{3000}.
Peptidsynthese: 3 g H-Gly-PEG_{3000} (2 mmol) werden in 20 ml CH_2Cl_2 gelöst (Lösung A). In einem separaten Gefäß werden zu einer Lösung von 1.75 g (10 mmol) BOC-Gly-OH in 5 ml CH_2Cl_2, 113 mg (5 mmol) DCCI bei 0° C zugefügt. Nach ca. 30 Minuten bei 0° C wird der entstandene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und die klare Lösung mit Lösung A vereinigt.

Anschließend wird die Lösung mit N-Methylmorpholin neutralisiert. Danach wird die Reaktionslösung (ca. 10 ml) eingeengt und ca. 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymerpeptid wird durch Zugeben von Diäthyläther ausgefällt. Die Kontrolle durch DC in Eisessig/Butanol/Wasser (3:1:1) auf Kieselgel ergibt, daß überschüssiges BOC-Gly-OH bereits nach der ersten Ätherfällung quantitativ entfernt worden ist. Der Umsatztest einer Probe mit Ninhydrin nach der Durchflußanalyse zeigt, daß die Kupplungsreaktion quantitativ verlaufen ist. Durch Behandlung des BOC-Gly-Gly-PEG mit TFA/CH_2Cl_2 (1:1) wird die Schutzgruppe abgespalten. Nach Aufabeitung (analog zu H-Gly-PEG_{3000}) des Produkts werden 2.98 g H-Gly-Gly-PEG_{3000} zurückerhalten.

In der gleichen Weise wird H-Gly-Gly-PEG_{3000} mit 5 mmol BOC-Pro-Anhydrid zur Reaktion gebracht. Nach Abspaltung der Schutzgruppe und Ausfällung mit Äther erhält man 2.96 g H-Pro-Gly-Gly-PEG_{3000}. Durch entsprechendes Umsetzen dieses Produkts mit BOC-Val-Anhydrid werden 2.96 g BOC-Val-Pro-Gly-Gly-PEG_{3000} erhalten.

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse : 6n HCl, 110°C, 72 h

	Gly	Pro	Val
theor.:	2	1	1
gef.:	1.8	1.00	1.04

4.1.3. Alkalische Hydrolyse des Peptidesters

Eine Lösung von 2.0 g BOC-Val-Pro-Gly-Gly-PEG_{3000} in 20 ml H_2O/Dioxan (1:1) und 3 ml 1N KOH wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Mit 3 ml 1N HCl wird neutralisiert und zur Trockne eingedampft. Das Produkt wird in 10 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 20 ml $CHCl_3/CH_2Cl_2$ (1:1) extrahiert. Nach Lyophilisieren der wässrigen Phase wird das rohe Tetrapeptid über eine Säule (2.5x50 cm)

mit Sephadex G-25 entsalzt. Die ninhydrinpositiven Fraktionen werden vereinigt und gefriergetrocknet. Es bleiben 186.9 mg Peptid zurück. Das Produkt verhält sich dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Systemen einheitlich.

4.1.4. Charakterisierung des Peptids

Das reine Tetrapeptid BOC-Val-Pro-Gly-Gly-H zeigt einen Rf = 0.48 (Laufmittel A).

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse : 6n HCl, 110°C, 72 h

	Gly	Pro	Val
theor.:	2	1	1
gef.:	2	0.9	0.95

Elementaranalyse: $C_{19}H_{32}N_4O_{10}$ MG 476

ber.:	C 53.27	H 7.47	N 13.08
geg.:	C 53.51	H 7.31	N 12.31

4.2. Synthese des Tetrapeptids BOC-Val-Pro-Gly-Gly-OH Über die Benzylankergruppe

4.2.1. Darstellung der Ankergruppen

1,4-(Bis-brommethyl)-benzol wurde käuflich erworben (Fa. Merck, Darmstadt).

a) p-Brommethylbenzoesäure

54,4 g (400 mM) p-Toluylsäure werden in 600 ml trockenem, siedendem Benzol gelöst. Unter Bestrahlung mit einer 100 Watt Lampe werden im Verlauf von 4 Stunden 64 g (400 mM) Brom zugetropft. Noch während der Zugabe von Brom fällt ein Teil der bromierten Säure bereits aus. Nach Beendigung der Bromzugabe wird die Lösung noch eine Stunde am Sieden gehalten. Beim Erkalten kristallisiert die p-Brommethyl-benzoesäure aus, die dann nach Trocknung aus Essigester umkristallisiert wird.

Ausbeute: 63.5 g (75 %)
Schmelzpunkt: 225-227° C
Literatur: 224-226° C (128)

b) p-Brommethylbenzoesäurechlorid (129)

21,5 g (0,1 Mol) p-Brommethylbenzoesäure werden mit 0.15 Mol Thionylchlorid unter Rückfluß und Feuchtigkeitsausschluß gekocht, bis die Gasentwicklung beendet ist (ca. 6 Stunden). Dann destilliert man das überschüssige Thionylchlorid im Wasserbad ab. Zur Entfernung letzter Reste Thionylchlorid wird das Produkt aus Betroläther 60-90 kristallisiert.
Ausbeute: 21 g (90 %)
Schmelzpunkt: 57° C
Literatur: 56° C (130)

4.2.2. Veresterung der Ankergruppe an PEG_{6000}

30 g PEG_{6000} (10 mM) und 7 g (30 mM) p-Brommethylbenzoesäurechlorid werden in 300 ml absolutem Toluol gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluß 12 Stunden am Rückfluß gekocht. Dabei wird zur Austreibung der entstehenden Salzsäure Stickstoff durchgeleitet. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wird das Polymer mit Äther ausgefällt und der Niederschlag sorgfältig mit Äther gewaschen. Nach einmaligem Umfällen aus CH_2Cl_2/Äther ist das Produkt dünnschichtchromatographisch rein.

4.2.3. Darstellung der Cs-Salze von BOC-Gly

Die Cs-Salze von BOC-Gly wird auf diese Weise dargestellt: 10 mM BOC-Gly werden in 50-100 ml Wasser suspendiert und langsam mit 5 mMol Cs_2CO_3 versetzt. Nach Beendigung der CO_2-Entwicklung wird die Lösung klar. Sie wird dann sofort eingefroren und lyophilisiert.
Das weiße Pulver wird über P_4O_{10} im Vakuum aufgehoben.

4.2.4. Die Veresterung des Cs-Salzes von BOC-Gly mit dem Brombenzyl-Polymer

Ein vierfacher Überschuß von Cs-Salz von BOC-Glycin wird in möglichst wenig DMF gelöst und zum Polymer, ebenfalls in DMF gelöst, zugegeben. Dann wird die Lösung bei 40°C im Dunkeln 24 Stunden gerührt.
In konzentrierter Lösung kann der Fortgang der Reaktion dadurch beobachtet werden, daß sich nach und nach am Rand das bei der Reaktion gebildete CsBr absetzt.
Nach Beendigung der Veresterungsreaktion wird am besten auf folgende Weise weitergearbeitet:
Aus der erkalteten Lösung wird das Polymer direkt mit Äther ausgefällt. Das Polymer wird dann in CH_2Cl_2 gelöst und der Niederschlag, bestehend aus CsBr und Cs-Salz von BOC-Glycin, wird abzentrifugiert. Die klare Lösung wird eingeengt und mit Äther ausgefällt und noch zweimal mit CH_2Cl_2/Äther umgefällt. Danach ist es dünnschichtchromatographisch rein.

4.2.5. Stufenweiser Aufbau des Peptids

Ausgehend von BOC-Gly-Anker-PEG_{6000} geschieht der stufenweise Anbau der weiteren Aminosäurederivate analog 4.1.2..

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse : 6n HCl, 110°C, 72 h

	Gly	Pro	Val
theor.:	2	1	1
gef.:	2,03	1	1.07

R_f = 0 (Laufmittel A).

4.2.6. Abspaltung vom Träger durch Hydrogenolyse mit heterogenen Katalysatoren

2 g Polymerpeptid werden in 20 ml MeOH/AcOH (1:1) gelöst, dann werden 350 mg Palladium/Aktivkohle zugegeben. In einem Autoklaven, der zweimal evakuiert und mit Wasserstoff gespült wurde, wird bei einem Wasserstoffdruck von 50 bar unter Rühren 12 Stunden hydriert. Nach Beendigung der Reaktion wird vom Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und das wasserunlösliche, BOC-geschützte Tetrapeptid abzentrifugiert und anschließend gründlich (5 mal) mit Wasser gewaschen und wiederum zentrifugiert.
Die vereinigten wässrigen Phasen werden lyophilisiert. Dünnschichtchromatographisch kann festgestellt werden, daß sich in dieser Phase neben dem Polymer noch Tetrapeptid befindet. Das abzentrifugierte Tetrapeptid wird mit Wasser ausgespült und ebenfalls lyophilisiert.
Zur Abtrennung der niedermolekularen Anteile wird das Polymer in MeOH gelöst und über Sephadex LH 20 gelfiltriert. Dünnschichtchromatographisch ist es dann rein; das Polymer läßt sich weder mit Ninhydrin noch mit Fluram anfärben. In der Aminosäureanalyse können keine Aminosäuren mehr gefunden werden.
Ausbeute: 115 g Boc-Val-Pro-Gly-Gly-OH

4.2.7. Charakterisierung des Peptids

Das Lyophilisat zeigte im Dünnschichtchromatogramm nur einen Fleck.
DC-Platte Kieselgel 60_{F254} Laufmittel A R_f = 0.48
Entwicklung der Platte erfolgte mit Ninhydrin, Chlor-Tolidin. Mit Dragendorff-Bürger-Reagens war kein PEG nachweisbar.

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse: 6n HCl, 110°C, 72 h

	Gly	Pro	Val
theor.:	2	1	1
gef.:	2	1.1	1.1

Elementaranalyse: $C_{19}H_{32}N_4O_{10}$ MG 476

ber.:	C 53.27	H 7.47	N 13.08
gef.:	C 53.82	H 7.56	N 13.6

5. Synthese von Modellhexapeptiden

5.1. Darstellung von Amino-PEG

a) MPEG-Tosylat

40 mg $MPEG_{5000}$ (8mMol) werden in 150 ml CH_2Cl_2 suspendiert, 36 g Tosylchlorid (190 mMol) und 6 ml abs. Pyridin zugegeben und über Nacht unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird auf ca. 100 ml eingeengt. Durch langsame Zugaben von 200 ml Äther wird das Polymer ausgefällt. Es wird über eine Glasfritte G3 abgesaugt und gründlich mit Äther nachgewaschen. Das Polymer wird in 400 ml Ethanol durch leichtes Erwärmen gelöst und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen.
Das Polymer wird abgefrittet und i.V. getrocknet.
Ausbeute: 36 g ≙ 87 % d.Th.

b) MPEG-Phthalimid

36 g MPEG-Tosylat (7 mMol) und 8.5 g Phthalimidkalium (46 mMol) werden in 100 ml DMF suspendiert und 3,5 h bei 120°C unter Durchleiten von Stickstoff gerührt. Nach Abkühlen lassen auf Raumtemperatur wird von Ungelöstem abgefiltert und aus dem Filtrat durch Ätherzugabe das Polymer ausgefällt. Das Polymer wird in 400 ml CH_2Cl_2 aufgenommen, von Unlöslichem abfiltriert und das Filtrat auf ca. 120 ml eingeengt.

Durch Zugabe von Äther wird das Polymer ausgefällt, abgefiltert und i.V. getrocknet.
Ausbeute: 35 g = 98 %

c) Amino-MPEG

35 g MPEG-Phthalimid (6.8 mMol) und 8 ml Hydrazinhydrat 100%-ig werden in 120 ml Ethanol suspendiert und über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Nach Erkalten auf Raumtemperatur wird von Ungelöstem abgefiltert und aus dem Filtrat durch Ätherzugabe das Polymer ausgefällt. Das Produkt wird in 350 ml CH_2Cl_2 aufgenommen, von Unlöslichem abgefiltert und das Filtrat auf ca. 100 ml eingeengt. Durch Zugabe von Äther wird das Polymer ausgefällt, abgefiltert und i.V. getrocknet.
Ausbeute: 33 g = 97 % d.Th.
Titration mit 0.1 n HCl ergab 94 % freie Aminogruppen.

Elementaranalyse: $C_{227}H_{457}NO_{114}$ MG 5000

theor.:	C 54.4	H 9.1	N .28
gef.:	C 53.3	H 8.53	N .31

5.2. Veresterung von Amino-PEG mit BOC-Tyr-OBzl

10 g Amino-PEG (1 mMol) werden in 150 ml CH_2Cl_2 gelöst. Separat werden 1.5 g BOC-Tyr(-OBzl)-OH (4 mMol) in 10 ml CH_2Cl_2 gelöst, bei 0°C unter Rühren mit 2 ml DCC-Lösung in CH_2Cl_2 (4 mMol) versetzt und 30 Minuten bei 0° C gerührt und dann zur Lösung von Amino-PEG gegeben. Etwa 50 ml CH_2Cl_2 werden abgezogen und die konzentrierte Lösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.
Das Polymer wird durch Ätherzugabe ausgefällt, aus DMF mit Äther umgefällt und i.V. getrocknet.
Ausbeute: 9.1 g = 91 % d.Th.
DC: Laufmittel A: $R_f = 0$
Beladung: 79.4 %

5.3. Synthese des Hexapeptids der Sequenz: BOC-Trp-Ile-Gly-Pro-Ile-Tyr-PEG

Ausgehend von PEG_{5000}-Tyr(OBzl)-BOC geschieht der stufenweise Aufbau der weiteren Aminosäurederivate wie folgt:
Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgt in 10%-iger Lösung mit TFA/CH_2Cl_2 (1:1) während 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wird die Lösung eingeengt und aus 20 ml CH_2Cl_2 mit Äther gefällt. Nach 30 Minuten Rühren im Eisbad wird abfiltriert und noch zwei mal mit Äther gefällt. Anschließend wird das Produkt einige Stunden bei 0.05 - 0.1 Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.
Zur Kupplung von BOC-Ile an H-Tyr(OBzl)-PEG werden 1.84 g BOC-Ile (9 mMol) und 2 ml 2M DCC-Lösung (4 mMol) 1 Stunde bei 0°C in 10 ml CH_2Cl_2 aktiviert. 8 g Peptidester werden in 20 ml CH_2Cl_2 gelöst und das voraktivierte Aminosäurederivat in das Reaktionsgefäß filtriert. Die Aminogruppen werden durch Zugabe von frisch hergestellter 1M N-Methylmorpholinlösung in CH_2Cl_2 neutralisiert (pH 6-7), bei sorgfältiger Entfernung der TFA -säure nach dem Abspaltungsschritt ist die Zugabe von 110% Base, bezogen auf die Aminogruppen, ausreichend. Die Reaktionslösung wird eingeengt und nach 2 Stunden Reaktionszeit (Raumtemperatur) durch Ätherfällung unterbrochen. Dazu wird das Methylenchlorid erst abgedampft und anschließend aus Äthanol mit Äther gefällt. Zur vollständigen Entfernung der Kupplungskomponente wird ein zweites mal aus CH_2Cl_2 mit Äther gefällt.
Ausbeute: 8 g. Auf vollständige Entfernung der aktivierten Aminosäure wird durch Dünnschichtchromatographie geprüft: Kieselgelplatten, Fließmittel (A), UV, Entwicklung mit Chlor-Tolidin-Reagenz, $R_f = 0$.
Der Umsatz der Kupplung wird durch den Ninhydrintest in Lösung kontrolliert.

Nach dem gleichen Synthesezyklus werden folgende Aminosäurederivate nacheinander umgesetzt:
BOC-Pro, BOC-Gly- BOC-Ile, BOC-Trp.
Das Produkt zeigte im Dünnschichtchromatogramm nur einen Fleck (DC-Platte, Laufmittel (A), R_f = 0) und besitzt folgende Aminosäurezusammensetzung:

	Tyr*	Ile	Pro	Gly	Trp
theor.:	1	2	1	1	1
gef.:	0.81	1.7	0.91	1	0.78

*15-30 % Tyr werden bei der sauren Hydrolyse zerstört.

Abspaltung der Benzyl-Gruppe von Tyrosin

5 g geschütztes Peptidderivat wird in MeOH gelöst (ca. 10%-ige Lösung), die Lösung mit AcOH auf pH 6 gebracht und nach Zugabe von Pd-Schwarz mit H_2 hydriert, bis die H_2-Aufnahme beendet ist (ca. 20 Stunden). Dann wird vom Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt aus CH_2Cl_2 mit Äther gefällt.
Ausbeute: 4.2 g

5.4. Synthese des Hexapeptids der Sequenz:
BOC-Trp-Ile-Pro-Gly-Ile-Tyr-PEG_{5000}

Die Veresterung von Amino-PEG_{5000} mit BOC-Tyr(OBzl) erfolgt analog 5.2.. Die Kupplungen und Abspaltungen erfolgen analog 5.3..
Nach zweimaligem Umfällen aus CH_2Cl_2/Äther und zweimaligem Umfällen aus DMF/Äther war das Produkt dünnschichtchromatographisch rein.
Einwaage: 5 g Ausbeute: 4.4 g
DC-Platte Kieselgel 60_{F254} Laufmittel (A) R_f = 0
Entwicklung der Platte erfolgte mit Ninhydrin und Chlor-Tolidin.

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse : 6n HCl, 110°C, 24 h

	Tyr	Ile	Gly	Pro	Trp
theor.:	1	2	1	1	1
gef.:	0.8	1.8	1	1.2	0.73

5.5. Synthese des Hexapeptids der Sequenz:
BOC-Trp-Ile-Pro-Aib-Ile-Tyr-PEG_{5000}

Die Synthese erfolgt analog 5.2. und 5.3..
Einwaage: 5 g Ausbeute: 4.6 g
Aminosäureanalyse:
Hydrolyse: 6n HCl, 110°C, 24 h

	Tyr	Ile	Aib	Pro	Trp
theor.:	1	2	1	1	1
gef.:	0.8	1.63	0.04	0.85	1

6. Darstellung der Homo-Oligo-Peptide

6.1. Darstellung von Oligo-Ile

6.1.1. Synthese von BOC-Trp-$(Ile)_n$-Tyr-PEG_{5000} (n = 1-6)

Die Veresterung von PEG_{5000} mit BOC-Tyr(OBzl) erfolgt analog zu 5.2.. Der Synthesezyklus wird entsprechend Tabelle 11 durchgeführt.

Tabelle 11: Kupplungsbedingungen bei der Synthese von BOC-$(Ile)_6$-Tyr(OBzl)-PEG

Stufe	LM	R.Z. (h)	Ü	Fällung	Ausbeute (g)
1---0	CH_2Cl_2	2	5	2/Äther	8
2---1	CH_2Cl_2	5	5	2/Äther	7.8
3---2	CH_2Cl_2	8	5	3/Äther	7.7
4---3	CH_2Cl_2/DMF	10	5	3/Äther	7.4
5---4	DMF/DMSO	10	5	3/Äther	7.1
6---5	DMF/DMSO	10	5	3/Äther	7.0

Abkürzungen: Ü = Überschuß an BOC-Ile-Anhydrid
R.Z.= Reaktionszeit
LM = Lösungsmittel

Zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppe wird das Produkt in TFA/CH_2Cl_2 (1:1) bei Raumtemperatur 20 Minuten stehen gelassen (10% G/V), dann wird die klare Lösung eingeengt, und durch Zugabe von Äther unter starkem Rühren und Kühlen das PEG-Peptid ausgefällt. Nach Absaugen, Waschen mit Äther und Trocknen wird das Produkt in wenig MeOH oder DMF aufgenommen und erneut mit Äther gefällt. Zur Kupplung wird das getrocknete Produkt in CH_2Cl_2 (10% G/V) gelöst, mit N-Methylmorpholin neutralisiert (frisch hergestellte 1 M Lösung in CH_2Cl_2) und bei 0°C mit 5-fachem Überschuß an BOC-Ile-Anhydrid (separat nach der DCC-Methode dargestellt (108)) versetzt. Die Kupplungszeit wird von 2 Stunden bis zu mehreren Stunden variiert. Der Umsatz wird durch Ninhydrin- und Fluramtest bestimmt.
Zur Erzielung einer klaren Lösung wird ab Stufe 4 zunächst eine verdünnte Lösung des PEG-Peptids in CH_2Cl_2/DMF bzw. DMSO hergestellt und vor Zugabe der aktiven Komponente

durch Abziehen des CH_2Cl_2 eingeengt. Die Lösung ist beim Beginn der Kupplungsreaktion 10%-ig und wird nach der ersten Zwischenfällung auf 20-30 % eingeengt.
Aminosäureanalyse: Boc-Trp-$(Ile)_6$-Tyr-PEG
Hydrolyse : 11n HCl, 120 h, 110°C

	Tyr	Ile	Trp
theor.:	1	6	1
gef.:	1	4.8	0.86

6.2. Synthese von BOC-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEG_{5000}

Die Veresterung von Amino-PEG_{5000} mit BOC-Tyrosin erfolgt analog zu 5.2.. Der Synthesezyklus wird entsprechend Tabelle 12 durchgeführt.

Tabelle 12: Kupplungsbedingungen bei der Synthese von BOC-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEG n = 7,10,12,14

Stufe	LM	R.Z. (h)	Ü	Fällung	Ausbeute (g)
1--0	CH_2Cl_2	5	8	2/Äther	10
2--1	CH_2Cl_2	5	8	2/Äther	9.4
3--2	CH_2Cl_2	5	8	3/Äther	9.1
4--3	CH_2Cl_2	5	8	3/Äther	9.
5--4	DMF/CH_2Cl_2	5	8	3/Äther	8.3
6--5	DMF/CH_2Cl_2	5	8	3/Äther	8
7--6	DMF/DMSO	5	24	3/Äther	7.3
8--7	DMF/DMSO	5	24	3/Äther	7
9--8	DMF/CH_2Cl_2	5	24	3/Äther	6.7
10--9	DMF/CH_2Cl_2	5	24	3/Äther	6.5
11-10	DMF/CH_2Cl_2	5	24	3/Äther	6.4
12-11	DMF/CH_2Cl_2	5	24	3/Äther	6.1
13-12	DMF/CH_2Cl_2	5	24	2/Äther	5.4
14-13	DMF/CH_2Cl_2	5	24	2/Äther	5.1

Abkürzungen s. Tabelle 11

Zur Kupplung wird bei dieser Synthese die Aktivestermethode mit DCC als Aktivierungsmittel benutzt. Dazu werden äquimolare Mengen an BOC-Met und DCC bei 0° C in wenig CH_2Cl_2 gelöst und die Lösung während 30 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Der aktive Ester wird unter Absaugen des ausgefallenen DC-Harnstoffes zur neutralisierten PEG-Peptidlösung gegeben.
Die Lösung wird nach ca. 30 Minuten stark eingeengt (ca. 30 %) und noch 8-24 Stunden rühren gelassen. Das PEG-Peptid wird danach durch Zugabe von Äther unter starkem Rühren und Kühlen ausgefällt.
Zur Abspaltung der Schutzgruppe wird das Produkt in TFA/CH_2Cl_2 (1:1) bei Raumtemperatur 30 Minuten unter Rühren stehen gelassen. Dann wird die klare Lösung eingeengt, und durch Zugabe von Äther unter starkem Rühren das PEG-Peptid ausgefällt. Ab Stufe 7 bis Stufe 9 wird diese Reaktion in reiner TFA durchgeführt.

Zur Konformationsuntersuchung und Distanzmessungen werden die Peptide der folgenden Sequenzen synthetisiert:

Boc-Trp-$(Met)_7$-Tyr-PEG_{5000}

Boc-Trp-$(Met)_{10}$-Tyr-PEG_{5000}

Boc-Trp-$(Met)_{12}$-Tyr-PEG_{5000}

Boc-Trp-$(Met)_{14}$-Tyr-PEG_{5000}

Aminosäureanalyse: 1-BOC-Trp-$(Met)_7$-Tyr-PEG_{5000}
Hydrolyse: 6n HCl, 24 h (48 ab Stufe 10)

	Tyr	Met	Trp
theor.:	1	7	1
gef.:	1	6.1	1

2-BOC-Trp-$(Met)_{10}$-Tyr-PEG_{5000}

	Tyr	Met	Trp
theor.:	1	10	1
gef.:	1	9.3	0.6

3-BOC-Trp-$(Met)_{12}$-Tyr-PEG_{5000}

	Tyr	Met	Trp
theor.:	1	12	1
gef.:	1	10.19	0.8

4-BOC-Trp-$(Met)_{14}$-Tyr-PEG_{5000}

	Tyr	Met	Trp
theor.:	1	14	1
gef.:	1	12.4	0.52

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Modellpeptide mit verschiedenen Sequenzen mit Hilfe der Liquid-Phase-Methode synthetisiert.
An diesen Peptiden wurden Konformationsuntersuchungen durchgeführt, wobei der Zusammenhang zwischen Kettenlänge, Solvatation, Schutzgruppen und Konformation untersucht wurden.
Dabei wurden spektroskopische Untersuchungsmethoden, insbesondere CD, IR und Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie zur Bestimmung der Sekundärstruktur herangezogen.

Die Konformationsuntersuchungen wurden an Polyäthylenglykol gebundenen Peptiden und an den abgespaltenen Peptiden durchgeführt. Der Vergleich der CD- und IR-Spektren von PEG-gebundenen Peptiden mit freien Peptiden hat gezeigt, daß sich die Anwesenheit der makromolekularen Estergruppe am C-Terminus des Peptids bei allen untersuchten Beispielen nicht störend auf die Konformation des Peptides auswirkte. Es wurde auch gezeigt, daß neben den Messungen des CD- auch andere Methoden zur Konformationsuntersuchung wie IR und Fluoreszenzemissions-Spektroskopie direkt auf PEG-gebundene Peptide angewandt werden können.
Der sich daraus ergebende Vorteil wurde an mehreren Beispielen aufgezeigt:
Konformationsuntersuchungen an unlöslichen Peptiden können nur wegen der solubilisierenden Wirkung des PEG sowohl in organischen Lösungsmitteln wie auch in Wasser durchgeführt werden.

Zum Studium der in Polypeptiden und Proteinen am häufigsten vorkommenden Strukturen (ß-turn, ß-Struktur und α-Helix) wurden geeignete Modellpeptide hergestellt.

Zum Studium der ß-turn-Konformation in Peptiden wurden Modell-, Hexa- und Tetrapeptide, die Gly-Pro- oder

Aib-Pro-Sequenzen in Positionen i+1, i+2 enthalten, synthetisiert.

Als Modellpeptide zur Untersuchung der ß-Struktur wurden eine Reihe von Homooligo-L-Ile-Sequenzen synthetisiert:

Boc-Trp-$(Ile)_n$-Tyr-PEG n = 1-7

Die α-Helix wurde an einer Reihe von PEG-gebundenen Homooligo-L-Met-Sequenzen untersucht:

Boc-Trp-$(Met)_n$-Tyr-PEG n = 7,10,12,14

Die Konformationen dieser Modellpeptide wurden im Festzustand mit Hilfe der IR-Spektroskopie und in Lösung mit TFA und Wasser als Lösungsmittel durch CD untersucht.
Erstmals wurde in dieser Arbeit die End-zu-End-Distanz obiger Modellpeptide mit Hilfe der Energie-transfer-Methode im Rahmen der Liquid-Phase-Methode bestimmt.

Die Ergebnisse dieser verschiedenen spektroskopischen Untersuchungen stimmen gut mit einander überein und bestätigen die empirischen Konformationsvorhersagen.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1) R. Schwyzer und P. Sieber, Nature 199, 172 (1963)
2) E. Wünsch, Z. Naturforsch. 22b, 1269 (1967)
3) M. Bodansky, M.A. Ondetti, S.D. Levine und N.J. Williams, J.Amer.Chem.Soc. 89, 6753 (1967)
4) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Breuer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda und H. Zahn, Z. Naturforsch. 18b, 1120 (1963)
5) M. Bodansky und N.J. Williams, J.Amer.Chem.Soc. 89, 685 (1967)
6) R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2149 (1963)
7) J.M. Stewart und J.D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H. Freeman und Comp., San Francisco (1967)
8) G. Losse, C. Madlung und P. Lorenz, Chem.Ber. 101, 1257 (1968)
9) N. Inukai, K. Nakano und M. Murakami, Bull.Chem.Soc. (Japan) 41, 182 (1968)
10) C.G. Horvath, B.A. Preiss und S.R. Lipsky, Anal.Chem. 39, 1422 (1967)
11) E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung und W. Parr, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 759 (1971)
12) G.P. Vlasow und A.Yu. Bilibin, Izv. Akad.Nauk.(UDSSR) Ser.Khim. 1400 (1969)
13) A. Loffet und J. Close, "Proc. 9th Europ. Peptide Symp." Orsay (1968), North-Holland Publishing Comp. Amsterdam (1968)
14) W. Voelter, K. Zech und N. Grubhofer, Z. Naturforsch. 28b, 625 (1973)
15) H. Eckstein, Dissertation Universität Tübingen (1970)
16) E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W.A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier und W. Parr, J.Amer.Chem.Soc. 92, 1736 (1970)

17) E. Wünsch, Angew.Chem. 83, 773 (1971)
18) H. Hagenmaier, Tetrahedron Letters, 293 (1970)
19) E. Bayer und H. Hagenmaier, Tetrahedron Letters, 2037 (1968)
20) H. Takashina, R.B. Merrifield und V. Vigneaud, J.Amer.Chem.Soc. 90, 1323 (1968)
21) R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 89, 304 (1964)
22) J.M. Stewart, Federation Proc. 27, 63 (1968)
23) A.Marglin und R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 88, 5051 (1966)
24) B. Gutte und R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 91, 501 (1969)
25) B. Hemmasi und E. Bayer, Int.J.Peptide Protein Res. 9, 63 (1977)
26) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, J.Amer.Chem.Soc. 88, 3164 (1966)
27) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, J.Amer.Chem.Soc. 90, 2953 (1968)
28) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, Biochemistry 11, 466 (1972)
29) D.A. Laufer, T.M. Chapman, D.I. Malborough, V.M. Vaidya und E.R. Blout, J.Amer.Chem.Soc. 90, 2696 (1968)
30) M.M. Shemyakin, Ya. Ovchinnikov, A.A. Kiriuschkin und I.V. Kozhevnikova, Tetrahedron Letter 2323 (1965)
31) R.H. Andreatta und H. Rink, Helv.Chim.Acta 56, 1205 (1973)
32) E. Bayer und M. Mutter, Nature 237, 512 (1972)
33) M. Mutter, E. Bayer und H. Hagenmaier, Angew.Chem. 83, 883 (1971)
34) M. Mutter, Dissertation Universität Tübingen (1972)
35) M. Schattenberg, Diplomarbeit Universität Tübingen
36) E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmann, J. Polster und H. Mauser, J.Amer.Chem.Soc. 96, 7333 (1974)
37) R. Eberle, unveröffentlichte Ergebnisse

38) I. Gatfield, Dissertation Universität Tübingen (1975)
39) H. Albrecht, Dissertation Universität Tübingen (1978)
40) H. Frank. H. Meyer und H. Hagenmaier, Chemikerzeitung 101 (1977)
41) G. Jung, G. Bovermann, W. Göhring und G. Heusel in "Peptides, Chemistry, Structure and Biology", Proc. 4th Amer.Pept.Symp., Ann Arbor Sci. Publ. (1975)
42) F.A. Momany, R.F. McGuire, A.W. Burgess und H.A. Scheraga, J.Phys.Chem. 79, 2361 (1975)
43) L. Pauling und R.B. Corey, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 37, 729 (1951)
44) C. .F. Blake, Progr. in Biophysics 25, 83 (1972)
45) J.C. Conrad, Dissertation, Stanford Universität (1973)
46) C.B. Anfinsen und H.A. Scheraga, Adv. in Protein Chem. 205 (1975)
47) C.B. Anfinsen, Science 181, 223 (1973)
48) A.J. Hopfinger, "Conformational Properties of Macromolecules" Academic Press, New York (1973)
49) G. Nemethy und H.A. Scheraga, Biopolymer 3, 155 (1965)
50) F.A. Momany, L.M. Carruthers und H.A. Scheraga, J.Phys.Chem. 78, 1621 ibid. s. 1595 (1974)
51) K.H. Meyer und H. Mark, Ber. 61, 1932 (1928)
52) L. Pauling, R.B. Corey und H.R. Branson, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 37, 205 (1951)
53) W.T. Asbury und H.J. Woods, Nature 127, 663 (1931)
54) A.E. Mirsky und L. Pauling, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 22, 439 (1936), L. Pauling, J.Amer.Chem.Soc. 62, 2643 (1940)
55) W. Kauzmann, in "The Mechanism of Enzyme Action" (W.D. McElroy und B.Glass, Eds.), Johns Hopkins Press, Baltimore, 70 (1954)
56) W.Kauzmann, Advan.Protein Chem. 15, 1 (1959)
57) G.D. Fasman, "Poly- α-Amino Acids", M. Dekker, Inc., New York (1967)

58) E.R. Blout und Asadourian, J.Amer.Chem.Soc. 78, 955 (1956)
59) E.R. Blout, C. de.Lozé, S.M. Bloom und G.D. Fasman, J.Amer.Chem.Soc. 82, 3787 (1960)
60) E.R. Blout, in "Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins" (M.A. Stahmann, ed.), Univ. Wisconsin Press Madison, 275 (1962)
61) M.F. Perutz, J.C. Kendrew und H.C. Watson, J.Mol.Biol. 13, 669 (1965)
62) J.C. Kendrew und Brookhaven Symp.Biol. 15, 216 (1962)
63) W. Moffitt, Proc.Natl.Sci.U.S. 42, 731 (1956)
64) W. Moffit und A. Moscowitz, J.Chem.Phys. 30, 648 (1959)
65) G. Holzwarth und P. Doty, J.Amer.Chem.Soc. 87, 218 (1965)
66) K. Rosenheck und P. Doty, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 41, 1775 (1961)
67) F.A. Bovey, "Polymer Conformation and Configuration", Academic Press, New York, 68 (1969)
68) B. Zimm und J. Bragg, J.Chem.Phys. 31, 526 (1959)
69) S. Lifson und A. Roig, J.Chem.Phys. 34, 1963 (1961)
70) P.J. Flory "Statistical Mechanism of Chain Molecules" Interscience, New York (1969)
71) G.N. Ramachanderan, C. Ramakrishnan und V. Sasisekharan, in "Aspects of Protein Structure" (G.N. Ramachandran, ed.), Academic Press , New York, 121 (1963)
72) A.M. Liqouri,J.Polymer Sci. C. 12, 209 (1966)
73) R.A. Scott und H.A. Scheraga, J.Chem.Phys. 45, 2091 (1966)
74) S. Lifson, J.Chem.Phys. 40, 3705 (1964)
75) M. Goodman und N.s.Choi, in "Peptides" (E. Bricas, ed.), North-Holland, Amsterdam, 1 (1968)
76) "Peptides Polypeptides and Proteins", Proc.of the Rehovot Symp., J. Wiley & Sons, New York (1974)
77) M. Rinaudo und Dormard, J.Amer.Chem.Soc. 89, 6360 (1976)

78) M. Goodman, A.S. Verdini, C. Toniolo, W.D. Phillips und F.A. Bovey, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 64, 444 (1969)

79) W.B. Gratzer und A. Doty, J.Amer.Chem.Soc. 85, 1193 (1963)

80) R.T. Ingwall, H.A. Scheraga, N. Berger und E. Katchalski, Biopolymers 6, 331 (1968)

81) M. Goodman, F. Naider und P. Rupp, Bioorg.Chem. 1, 310 (1971)

82) M. Goodman, P. Rupp und F. Naider, Bioorg.Chem. 1, 294 (1971)

83) Th. Förster, Ann.Physik 2, 55 (1948)

84) Th. Förster, in "Modern Quantum Chemistry", Hrsg. O. Sinanoglü, Academic Press, New York (1966)

85) J. Eisinger, Biochemistry 8, 3902 (1969)

86) J. Eisinger, B. Feuer und A.A. Lamola, Biochemistry 8, 3908 (1969)

87) R.H. Conrad und L. Brand, Biochemistry 7, 77 (1968)

88) S.A. Latt, H.T. Cheung und E.R. Blout, J.Amer.Chem.Soc. 87, 955 (1965)

89) L. Stryer und R.P. Haughland, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 58, 719 (1967)

90) A. Grinvald, E. Haas und I.Z. Steinberg, Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 69, 2273 (1972)

91) R.E. Dale und J. Eisinger, Biopolymers 13, 1573 (1974)

92) E. Haas, M. Wilchek, E. Katzir und I.Z. Steinberg, Prod.Natl.Acad.Sci.U.S. 72, 1807 (1975)

93) R. Guillard, M. Leclerc, A. Loffet, J. Leonis, B. Wilmet und A. Englert, Macromolecules 8, 134 (1975)

94) B. Jirgensons "Optical Activity of Proteins and Other Macromolecules" Springer-Verlag, Berlin (1973)

95) R.W. Woody, in "Peptides, Polypeptides, and Proteins" Proc. of the Rehovot Symp., 338 (1974)

96) G.M. Bonora, M. Palumbo und C. Toniolo, Macromol. Chem. 180, 1293 (1979)

97) L.J. Bellamy, "The IR Spectra of Complex Molecules", Methuen, London 166 (1966)
98) M. Palumbo, S.D. Rin, G.M. Bonora und C. Toniolo, Makromol.Chem. 177, 1477 (1976)
99) C. Toniolo, M. Palumbo, Biopolymers 16, 219 (1977)
100) C.M. Deber, Macromolecules 7, 47 (1974)
101) P.Y. Chou und G.D. Fasmann, Biochemistry 13, 222 (1974)
102) R. Bennett, J.Chem.Phys. 41, 3073 (1964)
103) J.B. Briks und S. Georghiou, Phys.Letters I, 355 (1967)
104) P.W. Schiller, Proc.Natl.Acad.Sci. 69, 975 (1972)
105) A. Englert, Personal Mitteilung (1978)
106) M. Goodman, C. Toniolo und F. Naider in "Peptides, Polypeptides and Proteins", Proc. of the Rehovot Symp., J. Wiley & Sons, New York (1974)
107) C. Toniolo, Biopolymers 10, 1707 (1971)
108) H. Hagenmaier und H. Frank, Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 353, 159 (1972)
109) H. Hagenmaier und M. Mutter, Tetrahedron Letters 9, 767 (1975)
110) C. Toniolo, G.M. Banora und A. Fontana, Int.J.Pept. Prot.Res. 6, 371 (1974)
111) M. Palumbo, S.Da. Rin, M. Bonora und C. Toniolo, Makromol.Chem. 177, 1477 (1975)
112) H. Edelhoch, R. Berlman, M. Wilchek, Biochemistry 7, 3893 (1968)
113) C. Toniolo, G.M. Bonora, S. Salardi und M. Mutter, Makromolecules 12, 620 (1979)
114) C. Toniolo, G.M. Bonora und M. Mutter, Int.J.Biolog. Macromolecules 1, 188 (1979)
115) P.Y. Chou und G.D. Fassman, Ann.Rev.Biochem. 47, 251 (1978)
116) A. Fujie, M. Oya, T. Kawai, Makromol.Chem. 69, 301 (1973)

117) L. Carpino, J.Amer.Chem.Soc. 81, 955 (1959)
118) W. König, R. Geiger, Chem.Ber. 103, 955 (1970)
119) A. Nietzky, G. Braunschweig, Chem.Ber. 27, 3381 (1894)
120) E. Müller, G. Zimmermann, J.Prakt.Chem. III 293, 284 (1925)
121) S. Moore, D.H. Spackmann und W.H. Stein, Anal. Chem. 30, 1185 (1958)
122) D.J. Mc Caldin, Chem.Rev. 60, 39 (1960)
123) R.A. Fahmy, A. Niederwieger, G. Pataki und M. Brenner, Helv.Chim.Acta 44, 2022 (1961)
124) F. Riendel und W. Hoppe, Chem.Ber. 87, 1103 (1954)
125) G. Pataki, J.Chromatogr. 12, 541 (1963)
126) K. Bürger, Z.Anal.Chem. 196, 251 (1963) und 224, 421 (1967)
127) E. Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 702, 188 (1967)
128) G.H. Daub und R.N. Castle, J.Org.Chem. 19, 1577 (1954)
129) F. Vernon und H. Eccles, Anal.Chim.Acta 77, 146 (1975)
130) J. Titley, J.Chem.Soc. 2581 (1928)

Meine akademischen Lehrer waren:

In Kairo

S. Abdel Rahman, W. Awad, F. Badar, F. El Nwehy, H. El Sadik, Y. Eskander, A. Fateen, F. Fahmy, F. Ismail, N. Massak, G. Mousa, F. Micael, S. Nashed, S. Sabet, A. Sammour, R. Shaker, N. Shams, S. Tobia

In Tübingen

E. Bayer, I.P. Lorenz, D. Oelkrug, M. Mutter

LEBENSLAUF

26.3.1950	Geburt in Port-Said/Ägypten
1956 - 1962	Besuch der Primary School in Port-Said
1962 - 1965	Besuch der Preparatury School in Port-Said
1965 - 1968	Besuch der Secondary School in Kairo
1968 - 1972	Chemiestudium an der Universität Ain-Shams, Kairo
1973 - 1976	Diplomarbeit (Msc. degree) bei Herrn Professor Dr. A.K. Fateen, Ain-Shams Universität, Kairo
Oktober 1977	Beginn der experimentellen Doktorarbeit am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. Bayer Der Titel lautet: "Synthese von Modellpeptiden zur Konformationsuntersuchung"
August 1980	Ende der experimentellen Doktorarbeit